

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

**Análisis de las vías de inducción de autofagia en neuronas,
y su papel neuroprotector en un modelo transgénico de
la enfermedad de Alzheimer**

Irene Benito Cuesta

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)
Madrid, 2017

Memoria de investigación presentada por
Irene Benito Cuesta
para optar al título de
Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por el
Dr. Francisco Wandosell Jurado
Profesor de Investigación del CSIC y profesor *Ad Honorem* del Departamento de
Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid



Irene Benito Cuesta ha recibido financiación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) dentro del programa JAE-Predoc para la realización de la Tesis Doctoral (Resolución del 24 de enero de 2011; BOE 3 de febrero de 2011). El trabajo del laboratorio ha sido financiado en parte a través de los proyectos CAM S2010/BMD-231-(2010-14); Plan Nacional DGICYT, SAF2012-39148-C03-01(01-02-2013; 30-06-2016); COST-EU Framework Prog. H2020 CA15138, (ref. OC-2015-1-19840); Proyecto I+D+i Retos 2015, SAF2015-70368-R (2016-2018); ISCIII-CIBERNED –Proyectos Colaborativos- PI2016/01 (2017-2018).

A toda la gente que quiero y que me quiere.

Hay mucha gente a la que me gustaría agradecer esta tesis, no sólo a aquellos que me han acompañado durante estos años, sino también a los que anteriormente me ayudaron a llegar hasta aquí y ser la persona que soy.

Primero, por supuesto, al lugar donde se ha incubado este trabajo y ha sido testigo de sus altibajos. Me gustaría agradecer a mi director de tesis Paco su guía y su presencia en cualquier momento, por hacerme un hueco cuando no lo había y por ayudarme tanto con la escritura, pero también por compartir sus anécdotas haciendo más amenas las tardes de trabajo.

A toda la gente que ha pasado por el laboratorio 206 de la que he aprendido enormemente: los presentes que me han dado una genial compañía en los últimos años Lara O, María José P, Mario, Beatriz, Miri, Juan, Ángel, Alazne y Sergio; pero también a los que ya partieron dejándonos su huellita Nuria, Laura M, Marta, Jorge, María José B, Jose Luis, Adrián, Carlota, Sergio y Laura, Rocío, Paula... A Lara O, a Juanjo y a Nuria he de agradecer especialmente mis primeros torpes pasos con las técnicas del laboratorio, y a María José, Mario, Beatriz, Miri y Juan tantos buenos ratos de charlas sobre ciencia...o no tan ciencia :P.

No obstante, empecé a gatear antes, por lo que he de agradecer a Javier Yajeya y a Mauricio el fantástico año de *rock and electrophysiology*, y a Luis Miguel y María Ángeles los dos veranos que me acogieron en un laboratorio tan didáctico, con tan buen ambiente y trabajo en equipo, y por supuesto a todas las chicas que tan bien me cuidaron, a Isa, a María S, a Julia, a Estefi, a Jole, a Daniela, a Olga, a Alex, a Paloma y a María, ... ¡seguro que se me olvida alguien!

Pero he de agradecer su ayuda a mucha más gente del CBM, que en un momento u otro me han socorrido con sus conocimientos (o materiales :P). A los vecinos del 207, a Javier, Sara, Mauro, Iván, Raquel, Frida, Jara y sobre todo a Yurika que no sólo me iluminaba con su sagrada recopilación de protocolos, sino que además siempre estaba disponible para ayudarme o incluso para pasar un buen rato. A los next-vecinos del 208, siempre dispuestos a echarme un cable, especialmente a Raquel, Noe, Patri, Vega, Juan, Julia, Alberto... aunque en mi caso he de estar agradecida sobre todo por el increíble amigo que encontré en Jesús Merchán. Continuando por el pasillo agradecer al 209 su ayuda y su grata compañía, a Parras, Ivó, Marta, Miriam, Ainara y especialmente a María Santos, de la que también he podido disfrutar de su apoyo y gran amistad entre cafés y conciertos con Íñigo (Yggdrasil!!!), además claro de sus enseñanzas en el C-01.

Abandonando el pasillo, hay otra mucha gente a la que he de agradecer su socorro y compañía. A todos los del SMOC, especialmente a Carmen, Maite y María Ángeles que son las que más me han sufrido y de las que más he aprendido. A las chicas de microscopía electrónica, Maite, Milagros y Tamara, cuyas enseñanzas fueron muy interesantes y la compañía mejor aún. Al laboratorio de JA Esteban, Yolanda, Carla, Cris, Raquel, Marta, Jonny, Anna, Argentina y María, que me ayudaron tanto y me hicieron un huequito en cultivos cuando más lo necesitaba. A Almudena García, por su siempre cariñosa sonrisa y nuestras charlas, ya fuera en cultivos o en visitas al confo entre incubaciones los sábados. A Silvia y a Marta del 305, por su ayuda y compañía. A Lola Ledesma, Azucena y Enrique por echarme una mano con diferentes técnicas en neuronas. A Ignacio Sandoval por su disponibilidad y cercanía para ayudarme a interpretar el Golgi. A Laura Contreras y a Araceli, el alma de las fiestas... y del FRET :P. Al equipo de María Jesús Bullido por toda su ayuda, a Henri, a Jesús, a Patricia y a María. A María Eugenia, que me apoyó y me ayudó tanto en el manejo de ratones, así como a la gente de cocinas, a Juan y a Toñi, que nos facilitan tanto la vida.

También a Pilar, cuyo cariño llega todos los días a las 17:15 al 206, y a Marta, David, Reyes y Germán, que todos los días al entrar te recibían con una sonrisa.

A Ana Franco, mi rayito de sol, gracias por darme tantas fuerzas y hacerme confiar en mi criterio.

A los matemáticos Pablo, Marta, Álvaro, María, Álvaro P, Paco, Carlos, Juan, y en especial a, Miguel, Sonja y David, Jose Luis y Manu, con los que, junto con Miriam, Juan, Mario, Jesús y Tamara, he disfrutado tantas comidas y cenas, y me han dado un ratito de evasión diaria de la tesis, por su apoyo y tantos buenos ratos dentro o fuera del campus.

Y hablando de buena gente y evasión, gracias a tanta gente maravillosa que he conocido en el albergue de Nueva Vida y a mis peluditos, mi burbuja de oxígeno siempre que podía escaparme, y en especial a Ani y Sandra, que me han apoyado tanto cuando estaba más flojilla.

Pero antes de empezar esta maratón, mucha otra gente me ha acompañado en el camino hasta llegar a aquí. Gracias a todos ellos por las buenas experiencias, a los compañeros de biotecnología en Salamanca, a David, Marta, Paula, Manu y Emma por tan buenos ratos. Pero también a Elenita, José y Elena, Rico y Kath, Garga, Rodri y Martín, que por muy lejos que estén siguen estando con nosotros. A mi maestro Ricardo, que me inculcó la serenidad y el significado de las artes marciales, y a mis compis de piso Marina y Bea que me dieron tan buenos momentos.

A los amigos de Viana, y en especial a Moni, que me dieron tan geniales veranos. A mis anteriores compañeros del instituto Zorrilla y muy en especial a los del colegio García Quintana en Valladolid, que me han hecho ser la persona que soy y tener recuerdos tan maravillosos. En especial a mi amiga Beiya, que desde los tres años me ha embarcado en las más rocambolescas aventuras siendo mi confidente y cómplice, y a la que quiero como a una hermana. Los lazos que nos unen son más fuertes que nuestras diferencias y la distancia.

A los que siempre han confiado en mí, a mi familia. A mis tíos y primos de Málaga y Madrid, por su alegría y espíritu de vida, y en especial a mi abuela Marisa, que tanto cariño tiene para dar y en cuanto llegamos tira la llave del corral. A la familia Benito Duque, a mis tíos y primos con los que he crecido, pero sobre todo a mis abuelos Mariano y María Eugenia, que siempre me han dado cariño y han estado ahí.

A mis padres, mi modelo, que me dieron el amor por la cultura, el conocimiento y su análisis crítico. Me enseñaron a valorar el trabajo bien hecho, pero también su intención, su fondo. Me enseñaron a ver más allá y, sobre todo, que lo más importante es hacer lo que te haga feliz, intentar ser la mejor persona posible, y a hacer lo que la conciencia te ayude a dormir. Gracias por apoyarme en mis decisiones y por tanto cariño que me dais.

A mi hermana Bea, ¡qué decir! Si con ser mi hermana ya lo digo todo. Gracias por estar siempre ahí, por protegerme ante otros y anti mí misma, por las gamberradas y las risas, por ser como eres.

A Fer, mi compañero, mi vida, eres parte de mí. Gracias por apoyarme y ayudarme en cualquier situación. Me siento muy afortunada de que estés a mi lado.

Índice

I. Abreviaturas	19
II. Resumen	23
III. Summary	27
IV. INTRODUCCIÓN:	31
1. La Enfermedad de Alzheimer	33
1.1. La neuropatología de Alzheimer	33
1.2. APP y su procesamiento postraduccional	34
1.2.1. Procesamiento alternativo de APP	35
1.2.2. Secretasas	35
1.2.3. Tráfico y metabolismo de APP	36
1.3. Tau y su procesamiento postraduccional	37
1.4. Hipótesis de la cascada amiloidogénica	38
1.5. Alteraciones de la proteostasis en la enfermedad de Alzheimer	39
2. Degradación mediada por Autofagia	40
2.1. Bases moleculares de la autofagia	40
2.2. Mecanismos de medición de la autofagia	42
2.3. Autofagia en neuronas	43
2.4. Implicación de la autofagia en la EA	43
3. Rutas de señalización celular implicadas en la regulación de autofagia y Alzheimer	45
3.1. mTORC1	45
3.1.1. Regulación por encima de mTORC1 (<i>upstream</i>)	45
3.1.2. Regulación por debajo de mTORC1 (<i>downstream</i>): Autofagia	47
3.1.3. Disfunción de la vía y su implicación en Alzheimer	47
3.2. AMPK	48
3.2.1. Regulación por encima de AMPK (<i>upstream</i>)	48
3.2.2. Regulación por debajo de AMPK (<i>downstream</i>): Autofagia	49
3.2.3. Disfunción de la vía y su implicación en Alzheimer	49
3.3. Modulación de autofagia dependiente de AMPK/mTORC1	50
3.4. Inducción de autofagia independiente de AMPK/mTORC1	50
3.4.1. Respuesta a estrés por activación de calpaína o JNK	50
3.4.2. Inducción de autofagia por disacáridos: Trehalosa	51
V. Objetivos	53
VI. Materiales y Métodos	57
1. Manipulación de ratones	59
1.1. Genotipado de ratones	59
1.2. Ensayos in vivo	60
2. Muestras de cerebros de pacientes de Alzheimer	60
3. Cultivo de líneas celulares	60

4. Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo	61
5. Tratamientos administrados a los cultivos celulares	62
6. Transformación de cultivos celulares	62
6.1. Transfección de DNA	62
6.2. Infección con vectores lentivirales	62
6.3. Alineamiento de secuencias	64
7. Ensayos de viabilidad celular	64
8. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (western blot)	64
8.1. Extracción proteica a partir de cultivos celulares para western blot	65
8.2. Extracción proteica de tejido cerebral	65
8.3. Western blot	65
9. Anticuerpos primarios	66
10. Inmunocitoquímica	67
10.1. Colocalización cuantitativa	67
11. Cuantificación de A β por ELISA	67
12. Ensayo de endocitosis de A β 40 unido a fluoróforo	67
13. Ensayo LysoSensor <i>in vivo</i>	68
14. Ensayo de actividad de la catepsina D	68
15. Microscopía electrónica de transmisión	68
16. Análisis estadístico	69

VII. Resultados **71**

1. Análisis comparativo de la alteración de la autofagia descrita en modelos de la patología de Alzheimer.	73
1.1. Análisis de marcadores de autofagia en tejido cerebral de pacientes con Alzheimer y del modelo murino de la enfermedad APP/PS1.	73
1.2. Caracterización de la autofagia basal en sistemas neuronales.	73
1.3. Conclusiones	75
2. La rapamicina reduce la amiloidosis en el ratón transgénico APP/PS1 por inducción de autofagia dependiente de mTORC1.	76
2.1. La rapamicina administrada intraperitonealmente tiene efecto en cerebro.	76
2.2. La rapamicina reduce los niveles de beta-amiloide en el ratón APP/PS1.	77
2.2.1. Efecto fisiológico de la rapamicina en ratones APP/PS1.	77
2.2.2. La rapamicina disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGNAPP/PS1.	79
2.3. La rapamicina aumenta discretamente el flujo autofágico en sistemas neuronales.	80
2.3.1. Rapamicina aumenta ligeramente el flujo autofágico y la consecuente degradación de adaptadores autofágicos por el lisosoma.	80
2.3.2. La mayor tasa de degradación por rapamicina está mediada por autofagia dependiente de ATG5.	82
2.4. El discreto aumento del flujo autofágico por rapamicina es connatural al sistema neuronal.	83
2.4.1. El efecto de la rapamicina en CGN observado con BafA1 es reproducido con otros bloqueantes de flujo.	83
2.4.2. El efecto de la rapamicina en CGN es reproducido por un inductor de	

autofagia independiente de mTOR.	83
2.4.3. La línea neuronal SH-SY5Y, pero no N1E-115, mimetiza la respuesta autofágica de CGN.	84
2.4.4. Análisis de la modulación de autofagia en neuronas en respuesta a la inhibición de mTORC1 por un déficit de aminoácidos.	85
2.5. La disminución de A β secretado por neuronas tratadas con rapamicina está mediada por autofagia.	89
2.5.1. Infección de CGN con lentivirus con ARN interferente frente a Atg5.	89
2.5.2. Análisis de compuestos inhibidores de las fases iniciales de la autofagia en SH-SY5Y.	90
2.5.3. IN1 y MRT previenen el flujo autofágico basal e inducido por rapamicina en CGN.	93
2.5.4. La inhibición del inicio de la autofagia revierte el efecto anti-amiloidogénico de la rapamicina en CGN.	94
2.6. Conclusiones	95
3. Modulación de la autofagia en neuronas a través de la vía dependiente de AMPK.	96
3.1. Activación de AMPK con 2DG.	96
3.2. Activación de AMPK con AICAR o Metformina.	100
3.3. Inhibición de AMPK con el Compuesto C.	102
3.3.1. CoC bloquea el flujo autofágico de manera independiente a la vía mTORC1.	103
3.3.2. CoC revierte la activación de AMPK por 2DG, AICAR o Metf.	104
3.3.3. CoC no modifica la señalización de mTORC1 y disminuye el flujo autofágico en CGN.	105
3.4. Efecto de la modulación de AMPK en la producción de A β 40 por CGN APP/PS1.	106
3.5. Efectos celulares de los moduladores de AMPK independientes de autofagia.	108
3.5.1. Metformina y AICAR disminuyen diferentes fosforilaciones de Tau.	108
3.5.2. La inhibición de fosfatasas revierte parcialmente la defosforilación de epítomos de tau por metformina.	109
3.5.3. Metformina y AICAR generan una activación de caspasa-3 no apoptótica.	111
3.6. Conclusiones	114
4. Efecto de la trehalosa en la amiloidosis neuronal.	115
4.1. Administración de trehalosa a ratones APP/PS1.	115
4.2. La trehalosa disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGN.	117
4.3. Modulación de los marcadores de autofagia en neuronas con trehalosa en el tiempo.	117
4.3.1. La Trehalosa aumenta el flujo autofágico a corto plazo.	119
4.4. La Trehalosa disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGN de manera independiente de autofagia.	121
4.5. La Trehalosa no induce el bloqueo de la secreción de A β , ni la endocitosis del ya secretado.	123
4.5.1. La Trehalosa no bloquea la secreción de A β 40.	123
4.5.2. La Trehalosa no induce la endocitosis del A β 40 ya secretado.	123

4.6. La Trehalosa disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP.	125
4.7. La Trehalosa modifica la morfología lisosomal sin alterar su funcionalidad o localización de APP y BACE1.	127
4.7.1. La Trehalosa no basifica las vesículas con pH ácido, necesario para la actividad beta-secretasa.	127
4.7.2. La Trehalosa aumenta el tamaño lisosomal sin afectar a la localización de las proteínas APP y BACE1 al mismo.	128
4.8. La trehalosa podría generar cambios en el tránsito cis-trans Golgi que segregasen las proteínas APP y BACE1.	130
4.9. Conclusiones	132
VIII. Discusión	133
1. La inducción de autofagia con rapamicina genera una disminución de la amiloidosis en cerebro y en neuronas aisladas.	135
2. Regulación de la señalización celular de la autofagia en neuronas.	136
2.1. PI3KCI-mTORC1 en la regulación de la autofagia en neuronas.	137
2.2. AMPK en la regulación de autofagia en neuronas.	138
3. Regulación de los niveles de Ab y fosfo-Tau por los moduladores de AMPK: mecanismos independientes de autofagia.	139
3.1. Efecto de los moduladores de AMPK en amiloidogénesis neuronal.	139
3.2. Metformina y AICAR aumentan la actividad fosfatasa disminuyendo los niveles de fosfo-tau.	140
3.3. Metformina, y en menor medida AICAR, generan una activación no apoptótica de caspasa-3.	141
4. Análisis del efecto anti-amiloidogénico de la trehalosa en neuronas.	143
4.1. Efecto de la trehalosa en neuronas: señalización y modulación de la autofagia.	143
4.2. Trehalosa disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP por segregación trans-Golgi de APP y BACE1.	144
5. Perspectivas futuras.	146
IX. Conclusiones	147
X. Bibliografía	151
XI. Anexo: publicaciones	165

ABREVIATURAS

2DG	2-desoxi-D-glucosa	JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
3MA	3-Metiladenina	LKB1	<i>liver kinase B1</i>
aa _s	aminoácidos	Metf	<i>Metformin/Metformina</i>
Aβ	<i>Amyloid-beta/ Beta-amiloide</i>	MRT	MRT68921
ADAM10	<i>a disintegrin and metalloproteinase-10</i>	mTORC1/2	<i>mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2</i>
ADP	adenosine diphosphate	NB	<i>Neurobasal® medium</i>
AG	Aparato de Golgi	NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1 protein</i>
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido	NFTs	<i>Neurofibrillary Tangles / Ovillos neurofibrilares</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>	o/n	<i>overnight/Durante la noche</i>
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>	P62	P62/SQSTM1 (<i>sequestosome 1</i>)
AMP	<i>5'-adenosine monophosphate</i>	PHFs	<i>Paired Helical Filaments / Filamentos apareados helicoidales</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	pi	post-infección
APP	<i>Amyloid Precursor Protein/ Proteína Precursora del Amiloide</i>	PIK3C1	(también conocido como PIK3CB) <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform</i>
APP/PS1	Ratón transgénico B6.Cg-Tg (APP ^{Swe} , PSEN1 ^{dE9})/J	PI3KCI	Complejo <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> de clase III
ATG	<i>Autophagy related genes</i>	PI(3)P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate/ fosfatidilinositol-3-fosfato</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	PIK3C3/Vps34	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>
a.u.	<i>arbitrary units/unidades arbitrarias</i>	PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
AV	<i>Autophagic Vesicle/Vesícula autofágica</i>	PP2B	<i>protein phosphatase 2B/ Calcineurin</i>
BACE1	<i>beta-site APP-cleaving enzyme-1</i>	PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
BafA1	<i>Bafilomycin A1/Bafilomicina A1</i>	PS1/2	Presenilina-1/2
Beclin-1	Proteína codificada por el gen <i>BECN1</i>	QVD	Q-VD-OPh (Calbiochem)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i>	Rag	familia de GTPasas Rag (Rag A, B, C y D)
Calp	Calpeptina	Rapa	<i>Rapamycin/Rapamicina</i>
CaMKK2	<i>Calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2</i>	Rheb	GTPasa <i>ras homolog enriched in brain</i>
Casp3	Caspasa-3	RT	<i>Room Temperature/Temperatura ambiente</i>
CGN	<i>Cerebellar Granule Neurons/ neuronas granulares de cerebelo</i>	S6K	Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1), también conocida como P70S6K
CoC	<i>Compound C/Compuesto C</i>	Sac	Sacarosa
CQ	Cloroquina	sAPP	<i>secreted APP fragment</i>
CTF	<i>APP C-terminal fragment/ fragmento C-terminal de APP</i>	shRNA	<i>short hairpin RNA/ARN de interferencia.</i>
Ctrl	Control	SP	Spautin-1 (<i>Specific and Potent Autophagy Inhibitor-1</i>)
DIV	<i>Days In Vitro/ Días In Vitro</i>	TGN	<i>Trans-Golgi Network/ Red trans-Golgi</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Treh	Trehalosa
DMSO	Dimetilsulfóxido	ULK	Complejo ULK compuesto por ULK1/2, ATG13, ATG101 y RB1CC1/FIP200
EA	Enfermedad de Alzheimer	uM/ul/ug	μM/μl/μg (empleamos u = micro para evitar errores de formato)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum/Suero Fetal Bovino</i>	v-ATPasa	ATPasa vacuolar
FOXO	<i>forkhead box protein O</i>	Wort	Wortmanina
Gmax	GlutaMAX™	WT	<i>Wild Type</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>		
HBSS	<i>Hank's Balanced Salted Solution</i>		
ICA	Análisis de Correlación de Intensidad / <i>Intensity Correlation Analysis.</i>		
ICQ	Coeficiente de correlación de Intensidad/ <i>Intensity Correlation Quotient</i>).		
IN1	VPS34-IN1 (<i>Vps34-Inhibitor 1</i>)		

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA), el trastorno neurodegenerativo más común, es una proteinopatía caracterizada por la deposición de agregados de péptido beta-amiloide (A β) y de tau hiperfosforilado. La acumulación de vesículas autofágicas en neuritas distróficas en el cerebro sugiere una disfunción progresiva de la degradación mediada por macroautofagia. En este proceso, una vesícula de doble membrana o autofagosoma secuestra una región del citoplasma para su fusión con lisosomas y degradación. En este proyecto pretendimos estudiar el efecto en neuronas de inductores de autofagia, previamente descritos, tratando de correlacionar la autofagia con la secreción/generación de amiloide. Así, empleamos el modelo murino de la EA B6.Cg-Tg(APP^{Swe}, PSEN1^{dE9})/J tanto para experimentos *in vivo*, como para cultivos primarios de neuronas obtenidos de estos ratones o de sus hermanos de camada *wild-type*.

Nuestros resultados indican una modesta inducción de autofagia en neuronas por la inhibición de mTORC1 con rapamicina, a diferencia de los drásticos efectos descritos en células tumorales. La administración de rapamicina generó una disminución de los niveles de A β tanto *in vivo* como *ex vivo* en neuronas cultivadas. La prevención farmacológica de autofagia aumentó la secreción de A β en neuronas, y revirtió el efecto reductor de la rapamicina. Concluimos que la inducción de la autofagia disminuye la secreción de A β a través de su degradación.

Procedimos a analizar la modulación de la autofagia en células neuronales por otros mecanismos, como la quinasa AMPK. Su inhibición con el Compuesto C generó la disminución en la inducción de la autofagia esperada, aunque sorprendentemente este bloqueo no aumentó la secreción de A β . Además, varios compuestos químicos que activan AMPK a través de diferentes mecanismos (Metformina, AICAR y 2DG probados), no sólo no indujeron autofagia, sino que incluso parecían moderarla. Estos compuestos presentaron diferentes efectos en la secreción de A β , no revertidos por la prevención de la formación de autofagosomas. Mientras que la Metformina disminuía los niveles de A β secretados, AICAR los aumentó. Estos resultados sugieren la implicación de procesos celulares dependientes o independientes de AMPK, y no permiten concluir un papel clave de esta quinasa en la autofagia neuronal *per se*. Aparte de la activación por Metformina de PP2A, Metformina y en menor medida AICAR inducían la defosforilación de tau en epítomos sensibles a PP2B y generaban una fragmentación de tau debido a una activación de la caspasa-3 no apoptótica. Estos eventos podrían estar relacionados con la modulación de los niveles de A β , aunque deberían analizarse más a fondo. Sin embargo, debido a la delicada regulación de la vía AMPK en las neuronas, así como a la modulación de los niveles de A β por mecanismos independientes de autofagia y/o AMPK, decidimos analizar otras estrategias no relacionadas con esta vía, como el uso del disacárido Trehalosa.

Se observó una importante disminución de A β en neuronas con Trehalosa, descrito como un eficiente inductor de autofagia mTORC1 independiente. Sin embargo, nuestros resultados indican una disminución del corte amiloidogénico de APP, de manera independiente de autofagia. Los datos preliminares sugieren una segregación de APP y BACE1 de la mano de la red trans-Golgi, presumiblemente debido a la modificación del sistema de endomembranas y expresión génica. No obstante, se necesitarían más experimentos para su confirmación.

En resumen, nuestros datos confirmaron los efectos anti-amiloidogénicos de la autofagia en neuronas, a pesar de la altamente regulada vía Akt-mTORC1, ya que la inhibición de mTORC1 sólo generó una ligera inducción de autofagia. Nuestros datos indicaron que un cierto nivel de actividad AMPK parece ser necesario, mientras que su mayor estimulación afecta a la progresión normal. Además, hemos identificado un efecto anti-amiloidogénico relevante de la Trehalosa a través de la segregación de APP y BACE1 en la célula, lo que podría ayudar al desarrollo de nuevas estrategias para combatir la enfermedad de Alzheimer.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disorder, is considered a proteinopathy characterized by deposits of aggregated amyloid-beta (A β) and hyperphosphorylated tau. The accumulation of autophagic vesicles within dystrophic neurites in the brain suggests a progressive dysfunction of the protein turnover mediated by macroautophagy. In this process, a double-membrane vesicle or autophagosome sequesters a cytoplasmic portion for its delivery to lysosomes and degradation. This project aimed to study the effect of different previously described autophagy inducers on the A β secretion, trying to correlate autophagy and amyloid secretion/generation. For this purpose, we used the AD mouse model B6.Cg-Tg (APP^{Swe}, PSEN1^{dE9})/J for experiments *in vivo* or primary neuronal cultures obtained from these mice or their wild-type littermates.

According to our results, we only appreciated a quite modest autophagic induction effect by the inhibition of mTORC1 with rapamycin in neurons, contrary to the drastic effects described in tumour cells. The administration of rapamycin showed a decrease on A β levels *in vivo* as well as in cultured neurons. The pharmacological prevention of autophagy in neurons increased the A β secretion and reversed the lowering effect of rapamycin. Consequently, we concluded that autophagy induction decreases the A β secretion through its degradation.

Therefore, we proceed to analyse the modulation of autophagy in neuronal cells by other main regulators such as the protein kinase AMPK. Indeed, its blockage with Compound C generated the expected decrease in autophagy induction, though surprisingly this inhibition did not increase the A β secretion. Moreover, various chemical compounds which activate AMPK through different mechanisms (Metformin, AICAR and 2DG tested) not only did not induce autophagy, but also seemed to damper it. Some of these compounds appeared to affect differently the A β secreted levels, not reversed by the prevention of autophagosome formation. Whereas Metformin could diminish the A β secreted levels, AICAR enhanced them. These results suggest different cellular responses through AMPK dependent and independent mechanisms, and do not permit to conclude a key role of AMPK in neuronal autophagy *per se*. Aside from the Metformin's activation of PP2A, Metformin and to a lesser extent AICAR induced tau dephosphorylation in PP2B sensitive epitopes and generated a tau fragmentation, at least partially due to a non-apoptotic caspase-3 activation. These events could be related to the modulation of A β levels, even though it should be further analysed. However, due to the delicate regulation of the AMPK pathway in neurons, as well as to the presumed independence of AMPK mediated autophagy in the modulation of beta-amyloid levels, we decided to analyse other strategies unrelated to this pathway, such as the disaccharide Trehalose.

We observed a relevant A β lowering effect with Trehalose, which has been described as an efficient mTORC1 independent autophagy inducer. Nevertheless, our results support an anti-amyloidogenic effect independent of autophagy induction, through diminishing the APP cleavage by beta-secretase. Preliminary data suggest a segregation of APP and BACE1 at the hand of the trans-Golgi network, presumably because of modifying the endomembrane system and gen-related expression levels. More experiments should be performed to confirm it.

In summary, our data confirmed the anti-amyloidogenic effects of autophagy in neurons, though the highly regulated Akt-mTORC1 pathway, as mTORC1 inhibition just led to a slight induction of autophagy. Our data indicated that a certain level of AMPK activity appears to be necessary, whereas its enhancement disrupts the normal progression. In addition, we have identified a relevant anti-amyloidogenic effect of Trehalose through segregating APP and BACE1 in the cell, which could help the development of new strategies to fight Alzheimer's Disease.

INTRODUCCIÓN

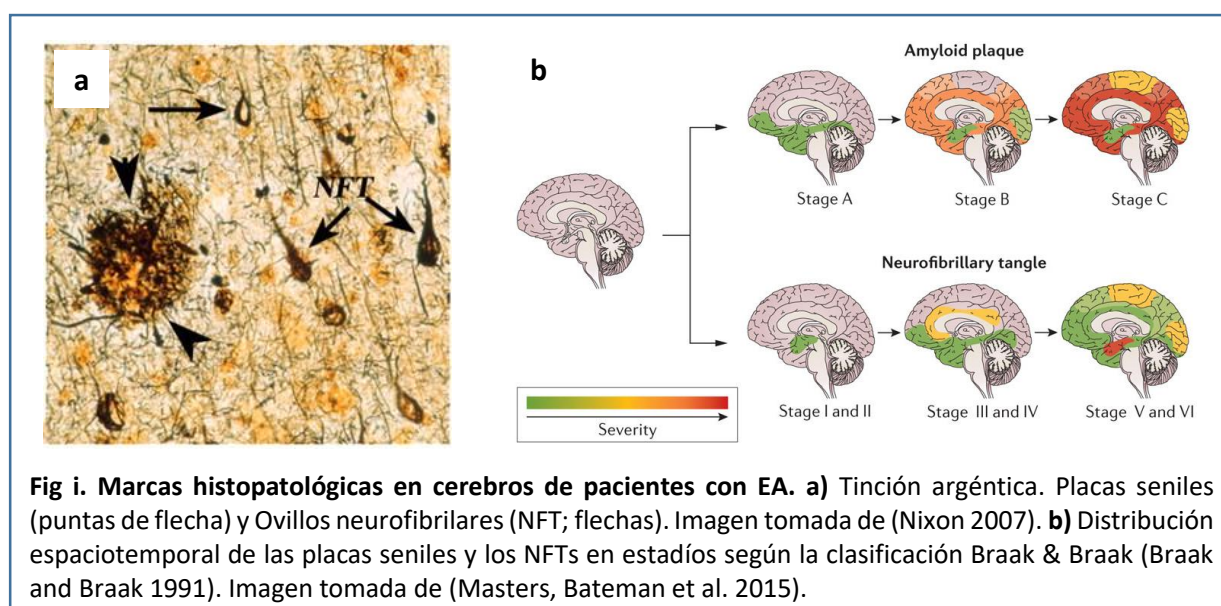
1. La Enfermedad de Alzheimer

El aumento de la esperanza de vida ha incrementado la prevalencia de enfermedades asociadas a la edad. Entre ellas destaca la Enfermedad de Alzheimer (EA) que constituye un 65% de los 47 millones de personas afectadas de demencia en todo el mundo (Cummings et al., 2016). La EA cursa con daños cognitivos, pérdida de la memoria a corto plazo y espacial, así como con desequilibrios emocionales. Estos síntomas se van agravando conforme avanza la enfermedad, afectando a la memoria a largo plazo y dando lugar a una pérdida total de las funciones ejecutivas. Se estima un periodo prodrómico de 20 años y una duración clínica media de 8 a 10 años. El carácter crónico e incapacitante de la EA, junto con su elevada incidencia y el aumento de la esperanza de vida, genera unos considerables costes socioeconómicos en todo el mundo.

Actualmente sólo cinco medicamentos están aprobados para su uso en humanos, aunque constituyen tratamientos que suavizan temporalmente los síntomas cognitivos sin enlentecer el avance de la enfermedad (Salawu et al., 2011; Cummings et al., 2016). Por otro lado, los avances en técnicas de diagnóstico han supuesto una gran mejora en la detección y seguimiento de la enfermedad desde fases preclínicas (Masters et al., 2015), lo que ha inspirado el diseño de estrategias terapéuticas para prevenir la acumulación de beta-amiloide inicial desde etapas prodrómicas (Masters et al., 2015).

1.1. La neuropatología de Alzheimer:

La EA es una demencia progresiva que se caracteriza a nivel macroscópico por la atrofia de diferentes partes del cerebro e incremento de espacio de los ventrículos, y a nivel microscópico por una cierta distrofia y pérdida neuronal y de sinapsis; además de un incremento relativo de la *gliosis* (microglia activada y astrocitos reactivos). Neuropatológicamente, se caracteriza por la presencia de dos tipos de inclusiones en el cerebro descritas por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer: las *placas seniles* formadas principalmente por agregados extracelulares del péptido beta-amiloide ($A\beta$), y los ovillos neurofibrilares intracelulares formados por tau hiperfosforilado (Fig i-a).



En los casos típicos de EA, los depósitos de A β preceden a los acúmulos de tau y distrofia neuronal, con un origen aparente en los lóbulos frontal y temporales, hipocampo y sistema límbico (Fig i-b) (Masters et al., 2015). Los ovillos neurofibrilares y la degeneración neuronal comienzan en los lóbulos temporales y el hipocampo, y se extiende progresivamente hacia otras áreas del neocórtex.

Existen dos grandes grupos de EA, la forma familiar o hereditaria y la forma esporádica (Agostinho et al., 2015).

- La forma familiar es la menos común (inferior al 5% de los casos) y tiene una aparición temprana (normalmente antes de los 60 años de edad). Hasta ahora, se han detectado mutaciones autosómicas causantes directas de la patología en tres genes: en el codificante de la proteína precursora del amiloide (*Amyloid Precursor Protein, APP*) o en una de las enzimas involucradas en su procesamiento presenilina 1 (PS1) y 2 (PS2).
- La forma esporádica es la más común, suele desarrollarse después de los 65 años de edad y su origen, desconocido, se ha asociado a diferentes factores de riesgo. Entre estos encontramos la edad, el sexo (las mujeres tienen más tendencia a la EA) o comportamientos rutinarios nocivos (inactividad física, fumar o un bajo entrenamiento mental). También se ha relacionado con algunas enfermedades cardiovasculares, problemas metabólicos (diabetes mellitus, resistencia a insulina, alto colesterol, hipertensión, obesidad), o patologías de carácter neurológico como la depresión o traumatismos craneales (Salawu et al., 2011; Masters et al., 2015). Además, se han descrito factores de riesgo genéticos, como la presencia de determinados alelos de ApoE, ApoJ o PICALM, que parecen estar implicados en el transporte y rutas de generación o eliminación del péptido A β (Bagyinszky et al., 2014).

Conforme a esto, en los últimos años ha habido un creciente interés en la descripción pormenorizada de los procesos degradativos y de su afectación en la EA, así como en el diseño de estrategias terapéuticas enfocadas a incentivarlos.

1.2. APP y su procesamiento postraduccional:

El péptido A β se produce por el procesamiento proteolítico de APP por diferentes proteasas, denominadas inicialmente como secretasas (Agostinho et al., 2015).

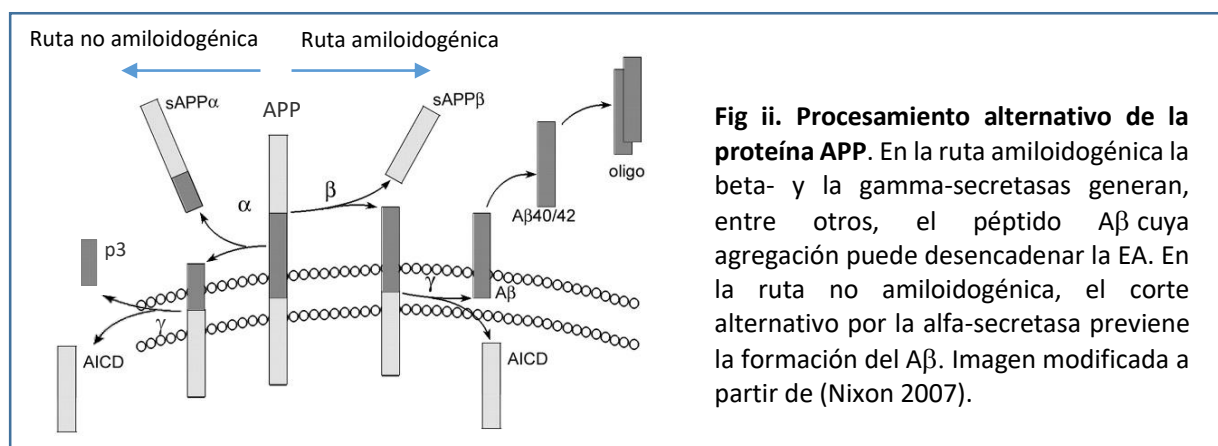
APP es una proteína transmembrana tipo 1 expresada en todo el organismo. Está codificada por un gen en el cromosoma 21 que genera al menos tres isoformas: en cerebro, APP695 se expresa principalmente en neuronas, mientras que APP751 y APP770 son más abundantes en glía. APP que pertenece a una familia altamente conservada en mamíferos junto con APLP1 y 2 (*amyloid precursor-like protein 1, 2*). Aunque la función no se conoce por completo, se ha visto que en cerebro esta familia está implicada en procesos de migración celular, sinaptogénesis y plasticidad sináptica. A pesar de sus similitudes bioquímicas y funcionales, sólo APP presenta el dominio correspondiente al péptido A β , por lo que es el único miembro de la familia que puede desencadenar la EA.

1.2.1. Procesamiento alternativo de APP

La proteína APP sufre numerosas modificaciones postraduccionales entre las que destaca su proteólisis. Ésta puede ocurrir por la acción de diferentes proteasas, que inicialmente se denominaron secretasas, dando lugar a productos alternativos en las denominadas rutas amiloidogénica y no amiloidogénica (Fig ii). Ambas rutas coexisten en condiciones fisiológicas en la célula:

- La ruta amiloidogénica se denomina así por generar el péptido amiloide tras dos cortes consecutivos por parte de la beta- y la gamma-secretasas (Fig ii). La beta-secretasa corta APP en la posición 1 relativa al péptido A β , generando el fragmento soluble sAPP-beta (*beta-secreted APP*) y el fragmento C-terminal (beta-CTF o C99) unido a membrana. Éste puede ser proteolizado por la gamma-secretasa generando el péptido A β con una longitud variable de 39-43 aminoácidos (Haass et al., 2012), y el fragmento intracelular AICD (*APP intracellular domain*).
- En la ruta no amiloidogénica, la alfa-secretasa corta APP dentro de la región A β entre los aminoácidos 14-16, generando el fragmento soluble sAPP-alfa (*alfa-secreted APP*), que se libera al medio extracelular, y el fragmento C-terminal (alfa-CTF o C83) unido a membrana. Éste puede ser proteolizado por la gamma-secretasa para generar los péptidos AICD y p3, que es degradado rápidamente (Fig ii).

Los metabolitos generados por el procesamiento de APP por ambas rutas también parecen tener funciones fisiológicas. El fragmento AICD constituye un importante regulador de la expresión génica, mientras que los péptidos sAPP-alfa y monómeros de A β comparten propiedades neuroprotectoras e intervienen en procesos neurotróficos y sinápticos. Por el contrario, la formación de oligómeros de A β presenta efectos neurotóxicos pudiendo provocar disfunción sináptica y muerte neuronal, características de la EA.



1.2.2. Secretasas

Se han caracterizado diferentes enzimas proteolíticas que pueden actuar como secretasas. Con actividad alfa-secretasa hay descritas tres enzimas de la familia ADAM (*α disintegrin and metalloproteinase*), las proteínas transmembrana de tipo 1 ADAM9, ADAM10 y ADAM17. Entre ellas, ADAM10 es la alfa-secretasa constitutiva para APP en neuronas y ejerce su actividad principalmente en la membrana plasmática.

La principal beta-secretasa identificada para APP es la aspartil proteasa 2 (Asp2) comúnmente conocida como BACE1 (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*). BACE1 es una proteasa transmembrana de tipo I que ejerce su función principalmente en orgánulos con pH ácido como los endosomas tardíos o lisosomas. También se han identificado otras aspartil proteasas capaces de ejercer la actividad beta-secretasa como la catepsina D (Schechter and Ziv, 2008).

La gamma-secretasa es un complejo de alto peso molecular formado por al menos cuatro proteínas integrales de membrana esenciales para su actividad: presenilina (PS, con dos homólogos, PS1 y PS2), nicastrina, PEN2 (*presenilin-enhancer 2*) y APO-1 (*anterior pharynx-defective-1*). La gamma-secretasa se encuentra principalmente en neuronas, aunque también se encontraron las subunidades PS1 y nicastrina en astrocitos y microglía reactivos.

1.2.3. Tráfico y metabolismo de APP

El correcto procesamiento del APP por ambas rutas, amiloidogénica y no amiloidogénica, es controlado por diversos mecanismos de regulación. Entre ellos, la ruta de proteólisis elegida depende mayoritariamente de la colocalización de las secretasas con APP, y por lo tanto de su tráfico intracelular y degradación (Agostinho et al., 2015).

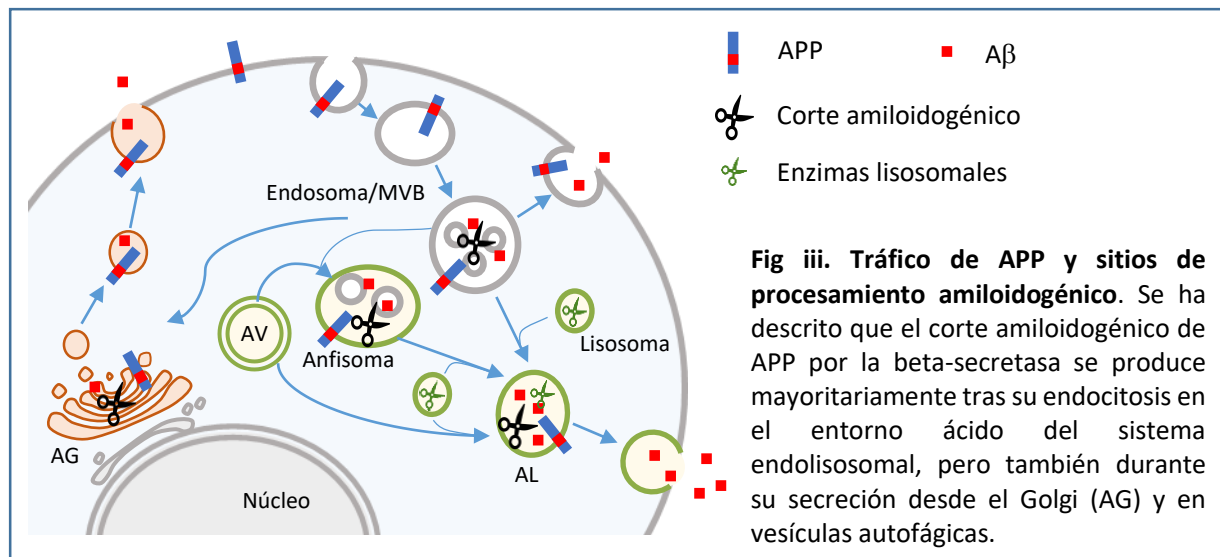
APP se sintetiza en el retículo endoplasmático y se transporta por la vía secretora constitutiva a través del aparato de Golgi (AG) y la red trans-Golgi (trans-Golgi network, TGN), sufriendo modificaciones postraduccionales como O- y N-glicosilación. Un 10% del APP sintetizado alcanza la membrana plasmática donde pueden ser endocitado y reciclado a la superficie celular o a la TGN (Haass et al., 2012) (Fig iii).

- En la ruta no-amiloidogénica, la alfa-secretasa ADAM10, tras recorrer la ruta secretora desde el AG, ejerce su actividad principalmente en la membrana plasmática, aunque también se ha descrito corte en alfa de APP en el Golgi (Haass et al., 2012).
- En la ruta amiloidogénica, la beta-secretasa BACE1 madura a su forma activa en el AG y atraviesa la vía secretora hasta situarse en la membrana plasmática donde colocaliza con APP. No obstante, BACE1 alcanza su máxima actividad a un pH ácido de 4.5, así que el corte de APP ocurre principalmente, tras ser internalizados, en endosomas tardíos y lisosomas. Desde el endosoma, BACE1 puede ser reciclado a la superficie o a la red TGN (Haass et al., 2012).
- Las cuatro subunidades de la gamma-secretasa forman el complejo maduro en su transcurso al Golgi/TGN. Este complejo realiza su actividad gamma-secretasa principalmente en la membrana plasmática y en el sistema endo-lisosomal, incluidas las vesículas autofágicas. No obstante, la gamma-secretasa y APP presentan complejos mecanismos de regulación mutua (Haass et al., 2012).

El procesamiento amiloidogénico de APP se puede producir entonces en el AG y ruta de secreción, en endosomas o en la ruta autofágica, aunque el tráfico a lisosomas desde estas rutas puede llevar también a la degradación de A β (Fig iii) (Nilsson and Saido, 2014). Un desequilibrio en estos mecanismos de regulación de la proteólisis y degradación puede desencadenar la EA.

En cuanto a la distribución neuronal, existe cierta controversia sobre la localización subcelular del procesamiento de APP. Se ha descrito una mayor producción de A β en la parte distal del axón y en

sinapsis, aunque también se ha observado secreción en dendritas. En el axón, APP y sus secretasas se transportan en diferentes vesículas evitando el procesamiento proteolítico (Haass et al., 2012). Además, se ha descrito que la mayor actividad neuronal aumenta la producción de A β , que a su vez aminora la función sináptica por lo que la amiloidogénesis podría constituir un sistema fisiológico de regulación de la actividad neuronal.



1.3. Tau y su procesamiento postraducciona:

La segunda marca histopatológica que define el Alzheimer es la acumulación de polímeros de proteína tau hiperfosforilada. Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP), que engloba al menos 6 isoformas producidas por *splicing* alternativo en mamíferos, tres con tres repeticiones del dominio de unión a microtúbulos R (tau 3R) y tres con cuatro (tau 4R) (Medina et al., 2016). Tau se expresa mayoritariamente en neuronas con una función principal de estabilización de microtúbulos, aunque también se ha descrito una implicación en otros procesos como la plasticidad sináptica (Avila et al., 2004; Ittner et al., 2010). La función de Tau se regula por múltiples modificaciones postraduccionales, como la fosforilación o la proteólisis, cuya alteración puede ser tóxica para la célula dando lugar a procesos neurodegenerativos. Así, aquellas patologías provocadas por la acumulación y polimerización de tau, formando ovillos neurofibrilares intracelulares, se conocen genéricamente como tautopatías, como la EA en este sentido.

Un desequilibrio en la actividad de las quinasas o fosfatasa puede dar lugar a una hiperfosforilación de Tau, que reduce su afinidad por los microtúbulos y tiende a polimerizar en filamentos apareados helicoidales (PHFs, *Paired Helical Filaments*), que se agregan formando ovillos neurofibrilares (NFTs, *Neurofibrillary Tangles*), alterando la estabilidad del citoesqueleto y el transporte axonal, llegando a provocar disfunción sináptica y neurodegeneración. Entre las quinasas implicadas en la fosforilación anómala de Tau destaca GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*), que fosforila sitios comunes a los PHFs (Medina and Avila, 2015). Además, varias fosfatasa son capaces de desfosforilar la proteína tau, siendo PP2A (*protein phosphatase 2A*) y PP2B (*protein phosphatase 2B*) las más implicadas.

Otra modificación postraducciona implicada en estos procesos neuropatológicos es la proteólisis de tau, por enzimas como caspasas o calpaínas (Hanger and Wray, 2010; Medina and Avila, 2015). Estas formas truncadas parecen facilitar la agregación de tau así como su propagación trans-sináptica. No obstante, se piensa que tanto la agregación en NFTs como la secreción de polímeros de tau, podrían constituir mecanismos de protección para neutralizar o eliminar las formas más tóxicas de tau hiperfosforilado y PHFs.

1.4. Hipótesis de la cascada amiloidogénica

La hipótesis de la cascada amiloidogénica propone que el desencadenante de la enfermedad de Alzheimer es la polimerización del péptido beta-amiloide inicial, generando oligómeros tóxicos que generaran las “placas seniles”. Agregados intermedios u oligómeros de A β son formas especialmente tóxicas que desencadenan alteraciones de la homeostasis neuronal entre las que destaca la hiperfosforilación de Tau, polimerización y formación de ovillos neurofibrilares, que finalmente dará lugar a la disfunción neuronal y a demencia progresiva. Durante la neurodegeneración, además se han descrito otros procesos patológicos como inflamación, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, o alteraciones de la señalización celular y del metabolismo de calcio; o muerte neuronal.

De esta manera, un desequilibrio en la proteólisis del APP a favor de la ruta amiloidogénica producirá mayores niveles de péptido A β que, por exceso, de no ser eficientemente eliminados, podrían acabar desencadenando el desarrollo de la EA (Selkoe and Hardy, 2016). Aunque el cerebro de una persona sana produce grandes cantidades de péptido A β con la edad, estas cantidades son mayores y suficientes para desencadenar la enfermedad en pacientes de Alzheimer. Por ello, a pesar de la controversia sobre el inicio de la patología en los pacientes con EA esporádica, las mutaciones en APP y PS de los casos familiares sostienen el importante papel desencadenante de esta ruta proteolítica. En cambio, mutaciones de tau desencadenan su acumulación intraneuronal, siendo ésta causa suficiente para la demencia progresiva observada en tauopatías como PSP (*progressive supranuclear palsy*) o la enfermedad de Pick (Hernandez and Avila, 2007).

Si bien se ha observado una relación directa entre la presencia de acúmulos de A β y la disregulación de tau (Selkoe and Hardy, 2016), se ha descrito que los efectos adversos de A β en degeneración neuronal y disfunción cognitiva parecen depender en gran medida de Tau. No obstante, sigue habiendo cierta controversia acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en la interrelación de los depósitos de A β con los de tau hiperfosforilado. Por un lado, se ha descrito que la acumulación de A β genera una hiperactivación de mTORC1 (Caccamo et al., 2011), la cual aumenta los niveles y fosforilación de Tau (Caccamo et al., 2013). Así, se ha descrito la fosforilación directa de Tau por las quinasas *downstream* a mTORC1 P70S6K (Pei et al., 2006; Zhou et al., 2008) y GSK3- β (Caccamo et al., 2013). GSK3- β es una de las principales quinasas descritas para las fosforilaciones de Tau asociadas a la EA, y se ha postulado como nexo entre la agregación de A β y la hiperfosforilación de Tau (Hernandez et al., 2010). Así, la unión del péptido A β a receptores de membrana interfiere en la señalización PIK3C1-Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) y WNT (*wingless-type MMTV integration site family*), provocando una mayor activación de GSK3 y fosforilación de Tau. También se ha descrito un aumento de la actividad de AMPK, por los depósitos de A β , que también puede actuar como quinasa de Tau directa (Mairet-Coello and Polleux, 2014).

1.5. Alteraciones de la proteostasis en la enfermedad de Alzheimer

La acumulación de una proteína que no puede ser correctamente degradada forma parte de la neuropatología asociada a enfermedades como Alzheimer, Párkinson, Huntington o priónicas, por lo que se consideran proteinopatías. Así, se define como proteinopatía cualquier patología causada por una proteína aberrante que desequilibre el correcto funcionamiento de células, tejidos y órganos. Estas condiciones patológicas son el resultado de alteraciones en la regulación de la proteostasis.

La proteostasis, u homeostasis proteica, consiste en el mantenimiento de las proteínas que constituyen el proteoma celular en la conformación, concentración y localización adecuadas para su correcto funcionamiento (Yerbury et al., 2016). Este proceso es fundamental para el mantenimiento de la fisiología celular y adaptación a estímulos. La preservación de la proteostasis depende de un delicado balance entre todos aquellos mecanismos que intervienen en la biogénesis, plegado, tráfico y degradación de proteínas. Un desequilibrio entre estos mecanismos puede dar lugar a la acumulación de proteínas, u orgánulos, disfuncionales o en exceso, llegando incluso a provocar procesos patológicos.

Las neuronas son especialmente dependientes del correcto mantenimiento de la proteostasis. Al ser células postmitóticas, son incapaces de diluir agregados proteicos u orgánulos disfuncionales por división celular (Ariosa and Klionsky, 2016). Además, su carácter altamente polarizado y excitable, con dendritas y axones cubriendo largas distancias, requiere la compartimentalización de dichos procesos proteostáticos y suplir sus elevadas necesidades energéticas.

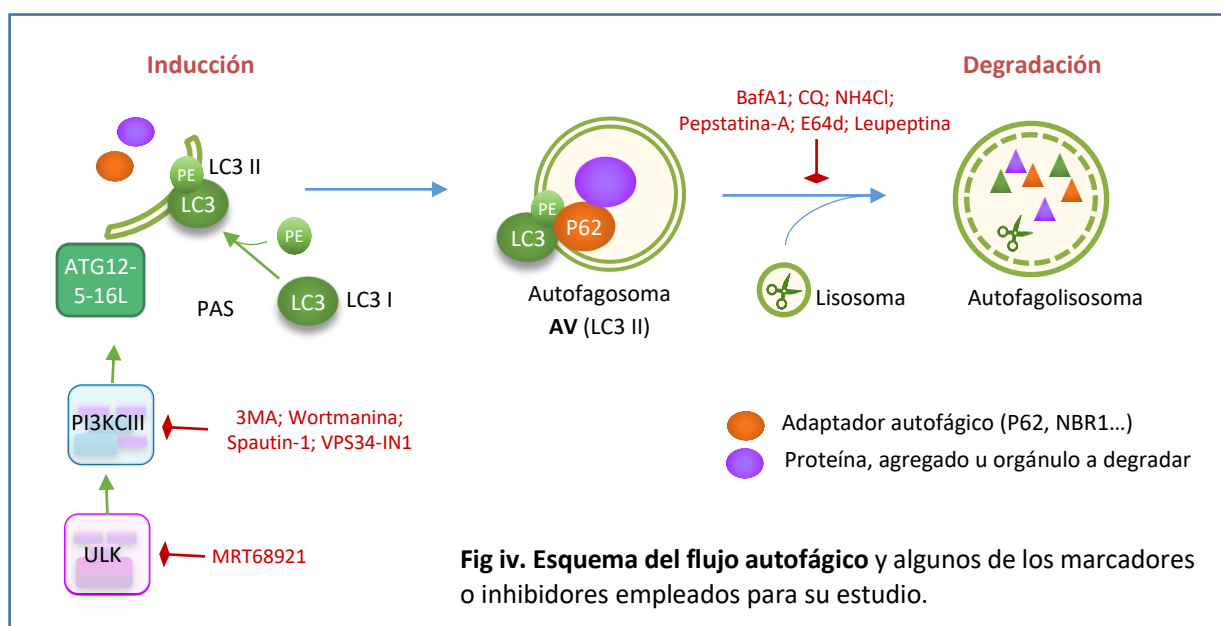
Los mecanismos de mantenimiento de la proteostasis pierden efectividad con la edad, el principal factor de riesgo de las proteinopatías neurodegenerativas de aparición esporádica. En este tipo de enfermedades se ha observado una gran implicación de fallos en rutas proteolíticas, como la degradación por proteasoma o autofagia. Más concretamente, en los cerebros de Alzheimer se han observado abultamientos en neuritas que contienen vesículas autofágicas representando estadios intermedios del proceso normal de autofagia, lo cual es indicativo de una alteración del mismo (Nixon and Yang, 2011). Además, se ha descrito que diferentes inductores de autofagia podrían tener efectos beneficiosos en proteinopatías asociadas a la edad. De esta manera, nos centramos en la ruta proteolítica por autofagia.

2. Degradación mediada por Autofagia.

La autofagia es el mecanismo catabólico por el cual la célula degrada componentes celulares innecesarios o disfuncionales a través de la acción del lisosoma en animales, o de la vacuola en plantas y levaduras (Mizushima and Komatsu, 2011; Boya et al., 2013). Dentro de la autofagia, se distinguen tres subtipos:

- Autofagia mediada por chaperona: La chaperona Hsp70 reconoce específicamente proteínas citosólicas con el motivo KFERQ y las conduce hasta la proteína Lamp-2A en la membrana lisosomal, donde son translocadas al interior para su degradación.
- Microautofagia: La membrana del lisosoma se invagina para secuestrar y degradar una pequeña parte del citoplasma.
- Macroautofagia: Se forma una membrana de aislamiento que secuestra una porción del citoplasma conteniendo orgánulos, proteínas o agregados proteicos, para su posterior fusión con el lisosoma y degradación de su contenido (Fig iv).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la macroautofagia, a la que nos referiremos comúnmente como “autofagia” a partir de ahora.



2.1. Bases moleculares de la autofagia

La autofagia se inicia con la formación de una membrana de aislamiento o estructura preautofagosomal, que secuestra distintos componentes del citoplasma en una vesícula autofágica o autofagosoma, abreviado como AV, que posteriormente se fusionará con el lisosoma para la degradación de su contenido. Este proceso dinámico entre la síntesis del autofagosoma y la fusión con el lisosoma se conoce como flujo autofágico (Fig iv).

En este proceso participan proteínas codificadas por genes *ATG* (*Autophagy related genes*) y pueden distinguirse las siguientes etapas (Rubinsztein et al., 2012; Ariosa and Klionsky, 2016):

- 1- Inducción de autofagia: En mamíferos, en la iniciación de la autofagia interviene el complejo ULK (compuesto por ULK1/2, ATG13, ATG101 y RB1CC1/FIP200 [*RB1-inducible coiled-coil protein 1*]). Así, ULK1/2 activo fosforila ATG13, RB1CC1 y a sí mismo desencadenando la inducción de autofagia.
- 2- Formación del fagoporo: El proceso comienza en los denominados PAS (*Phagophore assembly sites*), que pueden ser varios sitios en células de mamífero. El complejo ULK activa al complejo PI3KCIII (*Phosphatidylinositol 3-kinase* de clase III) que cataliza la conversión de fosfatidilinositol a fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P). Este complejo PI3KCIII está formado por un núcleo compuesto por PIK3C3/Vps34, BECN1 y PIK3R4/Vps15, y asociado a ATG14 y AMBRA1 desencadena la nucleación inicial de membrana y el reclutamiento de diferentes proteínas ATG, como WIPI1/2, generando una membrana de aislamiento o fagoporo. El complejo PI3KCIII con el núcleo proteico asociado a UVRAG continuará con la formación y maduración del autofagosoma. Existen mecanismos de regulación en este punto crítico como la unión inhibitoria de BCL2 a BECN1.
- 3- Elongación y formación del autofagosoma: la expansión del fagoporo se produce por la acción conjunta de las proteínas de unión a PI(3)P (WIPI1/2) y de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina catalizados por ATG7, el conjugado ATG12-ATG5 y el de LC3. ATG12 se une irreversiblemente a ATG5, y este conjugado se asocia a ATG16 para facilitar el reclutamiento y la reacción de lipidación de LC3 (u otros homólogos en mamíferos de Atg8 en levadura, como las subfamilias de GABARAP). Previamente, ATG4 proteoliza LC3 sintetizado como pro-forma para exponer la penúltima glicina dando lugar a la forma citosólica conocida como LC3I. LC3I es entonces reconocido y procesado por ATG7 y ATG3, para finalmente añadir una fosfatidiletanolamina (PE), facilitado por el complejo ATG12-ATG5-ATG16. La forma lipidada de LC3, conocida como LC3II, permite su anclaje a membrana, característico de AVs, hasta que sea degradado o delipidado por ATG4 para su reciclaje. Para el crecimiento del fagoporo se necesitan orgánulos que funcionen como donantes de membranas (mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, endosomas, membrana plasmática) o, en el caso del omegasoma, pueden llegar por movimiento lateral lípidos sintetizados *de novo* en el retículo endoplasmático. La identificación de los sustratos a degradar se realiza a través de adaptadores autofágicos, como P62 o NBR1, que a su vez reconocen la proteína LC3II (Kirkin et al., 2009; Johansen and Lamark, 2011).
- 4- Transporte y Fusión con el lisosoma: El autofagosoma puede fusionarse directamente con el lisosoma formando un autofagolisosoma, o previamente con un endosoma tardío formando un anfisoma, lo que le permite adquirir la proteína Rab7 para unirse a la proteína motora dineína y sufrir transporte retrógrado por microtúbulos hacia los lisosomas concentrados perinuclearmente. El complejo PI3KCIII-UVRAG, además de intervenir en la maduración del autofagosoma, también favorece la fusión lisosomal. El proceso de fusión incluye proteínas implicadas en mecanismos de transporte vesicular como las familias SNARE y ESCRT, revisado en (Borland and Vilhardt, 2017; Nakamura and Yoshimori, 2017).
- 5- Degradación y reciclaje: Una vez fusionados con el lisosoma, la membrana interna de la AV y su contenido se degradan por hidrolasas lisosomales. El pH ácido del lisosoma, mantenido por la bomba de protones ATPasa vacuolar (v-ATPasa), permite la actividad óptima de las catepsinas

lisosomales. Los metabolitos generados tras la proteólisis son bombeados al citosol para su reutilización por la célula.

2.2. Mecanismos de medición de la autofagia

Tanto LC3II como los adaptadores autofágicos P62 y NBR1 serán degradados en el lisosoma junto con el componente citoplasmático a eliminar, lo que nos permite utilizarlos como marcadores específicos de la autofagia. Sin embargo, la autofagia no es un proceso estático que permita su medición irrevocable por la cuantificación de los niveles de un marcador. Esto genera la necesidad de emplear diferentes estrategias de análisis para la determinación del flujo autofágico de manera no ambigua, recogidas en (Klionsky et al., 2016). En este proyecto empleamos algunas de las más comunes:

Presencia de vesículas autofágicas: Para medir los niveles totales de AVs en la célula, cuantificamos los niveles del marcador específico de las mismas LC3II. No obstante, un incremento de AVs puede deberse tanto a una mayor inducción de autofagia como a un peor aclaramiento por el lisosoma.

Degradación de adaptadores autofágicos: Una inducción de autofagia prolongada disminuye los niveles totales de proteínas degradadas específicamente por este proceso, como el adaptador autofágico P62. No obstante, este método presenta limitaciones en periodos cortos de tiempo y no permite discernir frente a otros procesos significativos a largo plazo, como una menor síntesis proteica del adaptador.

Bloqueo de la degradación lisosomal: La inhibición de la actividad lisosomal provoca la acumulación de los marcadores autofágicos (LC3II, NBR1, P62) que se hubieran degradado en ese periodo de tiempo. Para ello se emplean compuestos que basifican el lisosoma impidiendo la actividad de sus proteasas como Bafilomicina A1 (BafA1, *Bafilomycin A1*), que inhibe la bomba ATPasa lisosomal (Yoshimori et al., 1991; Yamamoto et al., 1998), NH₄Cl o Cloroquina (CQ). También se pueden emplear mezclas de inhibidores específicos de las enzimas proteolíticas como Pepstatina-A, E64d y Leupeptina. La diferencia observada en los niveles de cada marcador autofágico entre la condición basal y con el inhibidor lisosomal es una estimación de la tasa de degradación por autofagia y, por lo tanto, del flujo autofágico. Así, esta diferencia se vería incrementada al aumentar el flujo autofágico y disminuida al comprometerlo. Por tanto, este método constituye un indicador más fiable de la actividad autofágica a corto plazo.

Inhibición del inicio de la autofagia: Para determinar si un resultado observado está mediado por autofagia, puede revertirse dicho efecto interceptando el inicio de la formación del autofagosoma por diferentes estrategias:

- Interferencia de alguna proteína ATG, ya sea con ratones KO o con shRNA.
- Inhibición de PI3KCIII: clásicamente se han utilizado los compuestos 3-Metiladenina y Wortmanina, aunque éstos presentan cierta inespecificidad por PIK3C1. Actualmente, se han desarrollado inhibidores específicos de PI3KCIII como el compuesto VPS34-IN1 (Bago et al., 2014) o el inhibidor indirecto Spautin-1 (Liu et al., 2011).
- Inhibición del complejo ULK: En los últimos años se han caracterizado inhibidores específicos de ULK1/2 como MRT68921 (Petherick et al., 2015).

2.3. Autofagia en neuronas

Durante años ha habido cierta controversia sobre el papel de la autofagia en neuronas, ya que presentan bajos niveles basales de AVs. Actualmente hay consenso en que la autofagia es un proceso constitutivo e imprescindible para el correcto mantenimiento de la proteostasis neuronal.

De esta manera, existe un delicado equilibrio entre la formación y la eliminación de AVs, que permanecen a bajos niveles, altamente regulado en neuronas (Ariosa and Klionsky, 2016). El proceso completo de autofagia puede ocurrir en el cuerpo neuronal o en regiones axonales distales y terminales sinápticos. Las AVs formadas distales al soma también pueden sufrir transporte retrógrado por microtúbulos y fusionarse con lisosomas en el trayecto. Sin embargo, las AVs formadas en el compartimento somatodendrítico quedan restringidas al mismo sin acceder al axón. Por último, se ha descrito la existencia de autofagia trans-celular con astrocitos vecinos. Se observó la formación de una agrupación de mitocondrias en el axón, generando una protrusión que acabaría escindiéndose para seguidamente ser envuelta y degradada por un astrocito adyacente. Todos estos mecanismos reflejan la importancia de una rápida y controlada eliminación de estreses dañinos para la neurona.

Sin embargo, se ha observado que las neuronas podrían responder de manera diferente ante estímulos autofágicos en comparación con células no polarizadas (Ariosa and Klionsky, 2016). Algunos grupos describieron que la inducción de autofagia por compuestos ampliamente utilizados, como la Rapamicina, era eficiente en líneas neuronales inmortalizadas, pero no en cultivos de neuronas primarias (Tsvetkov et al., 2009; Tsvetkov et al., 2010; Kruger et al., 2012). Por tanto, estos estudios reflejan la necesidad de extremar la precaución a la hora de extrapolar los mecanismos regulatorios de autofagia de líneas inmortalizadas a neuronas, siendo imprescindible su estudio específico y verificación en diferentes sistemas neuronales.

2.4. Implicación de la autofagia en la EA

Por un lado, en consonancia con la necesidad esperada para un aumento del recambio de proteínas y para la protección contra los estímulos apoptóticos tales como mitocondrias dañadas, se ha sugerido que la macroautofagia constituye una respuesta temprana en el proceso de la enfermedad (Yu et al., 2005). Diferentes subtipos de AVs se acumulan patológicamente mientras la distrofia neurítica se desarrolla y APP, beta-secretasa y PS1 son abundantes en estos AVs, por lo que pueden ser una fuente de A β . En modelos celulares, se ha descrito una relación entre la inducción de macroautofagia y el aumento de la producción de A β , así como entre la supresión de macroautofagia y la reducción en los niveles de A β (Yu et al., 2005). De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que la síntesis de factores que promueven la autofagia, así como de componentes lisosomales, son producidos en mayor cantidad en los cerebros de pacientes con EA, mientras que los reguladores negativos de la autofagia son menores (Lipinski et al., 2010).

Por otro lado, la actividad autofágica y lisosomal disminuye con la edad, dando lugar a menores tasas de degradación y a la consecuente acumulación de proteínas y orgánulos disfuncionales, así como a distrofia axonal (Lipinski et al., 2010; Nixon and Yang, 2011). Estos efectos se ven acentuados en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, principalmente en la enfermedad de Alzheimer. Las neuritas distróficas cercanas a placas seniles muestran acúmulos de vesículas

autofágicas cargadas de proteínas sin terminar de digerir, similares a las observadas en enfermedades de depósito lisosomal o al bloquear la degradación lisosomal (Nixon and Yang, 2011). Así, se han descrito diversos factores que correlacionan la EA con una disfunción en la degradación por autofagia, tanto en casos familiares como esporádicos. La copia extra de APP en síndrome de Down o su mutación pro-amiloidogénica provocaría una sobrecarga de los procesos de degradación proteica, pero además PS1 mutado podría afectar a la acidificación lisosomal (Lee et al., 2010). Además, existe una predisposición asociada al gen ApoE que afecta al transporte del colesterol y al consecuente funcionamiento del sistema de endomembranas, o a PICALM que afecta a diferentes etapas del mecanismo de autofagia, revisado en (Bagyinszky et al., 2014; Menzies et al., 2017). Además, se ha descrito una disminución en los niveles de la proteína autofágica Beclin-1 en cerebros de individuos con EA, y que su sobreexpresión reducía la patología amiloide en un modelo murino de EA (Salminen et al., 2013). Por tanto, la restauración de una eficiente autofagia podría disminuir la patología asociada a la EA (Yang et al., 2011).

3. Rutas de señalización celular implicadas en la regulación de autofagia y Alzheimer

Existen diversas rutas de señalización implicadas en la regulación de la autofagia. Entre ellas destacan dos importantes ejes en la modulación del equilibrio entre anabolismo y catabolismo, mTORC1 y AMPK. Estas rutas integran señales metabólicas como disponibilidad de aminoácidos, factores tróficos (vía PIK3C1-Akt-mTORC1) o de oxígeno y glucosa (que definen los niveles energéticos vía AMP/ATP-AMPK). Además, rutas de respuesta a estrés también presentan efectos moduladores de autofagia. Así, se han descrito alteraciones de estas vías de señalización en la enfermedad de Alzheimer, por lo que su modulación, y consecuente efecto en autofagia, podría presentar efectos neuroprotectores en la patología.

3.1.mTORC1

El complejo mTORC1 está constituido por un centro catalítico mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que es una quinasa de serinas y treoninas, presente también en otro complejo proteico, mTORC2 (Shimobayashi and Hall, 2014). Ambos complejos contienen la subunidad inhibidora DEPTOR y mLST8/GβL. Además, mTORC1 consta de las subunidades RAPTOR y la inhibidora PRAS40, mientras que mTORC2 de RICTOR, mSIN1 y PROTOR1 (Fig v). RAPTOR en mTORC1, así como RICTOR y mSIN1 en mTORC2, intervienen en el reconocimiento de los sustratos de cada complejo promoviendo su señalización.

El complejo mTORC1 constituye un nodo central en la regulación del equilibrio entre los procesos celulares anabólicos de síntesis y los catabólicos de degradación y generación de energía (Saxton and Sabatini, 2017). Así, la presencia de nutrientes mantiene la ruta activa permitiendo la síntesis proteica, al fosforilar P70S6K y 4EBP favoreciendo la traducción, así como la síntesis de lípidos y nucleótidos, y el desplazamiento del metabolismo de glucosa de la fosforilación oxidativa a la glicólisis. Por el contrario, la inhibición del complejo por escasez de nutrientes provoca la inclinación de la balanza hacia procesos catabólicos de degradación proteica por autofagia y proteosoma, restaurando los niveles de aminoácidos y energía. En cambio, mTORC2 interviene en procesos de supervivencia y proliferación, aunque su regulación es menos conocida (Saxton and Sabatini, 2017).

3.1.1. Regulación por encima de mTORC1 (*upstream*)

mTORC1 integra diversas señales intra- y extracelulares, como la disponibilidad de nutrientes, niveles de energía o condiciones de estrés, que informan del estado metabólico y energético de la célula (Fig v) (Saxton and Sabatini, 2017):

- los aminoácidos derivados de la degradación lisosomal generan un cambio conformacional en la v-ATPasa. Ésta induce la actividad GEF (*guanine exchange factor*) del complejo Ragulator hacia el heterodímero de Rags a su conformación activa (RagA/B-GTP, RagC/D-GDP). Este heterodímero de Rags recluta mTORC1 a la superficie lisosomal (Shimobayashi and Hall, 2014).
- Los aminoácidos citosólicos activan mTORC1 por diversos mecanismos. Entre ellos, leucina y arginina previenen la inhibición del complejo GATOR2, que favorece la activación de mTORC1 Rag-dependiente. En cambio, glutamina promueve la activación Rag-independiente de mTORC1 por su localización lisosomal mediada por Arf1 (Jewell et al., 2015). Los niveles intra- y extracelulares

Los factores de crecimiento activan mTORC1 en la superficie del lisosoma de manera Rheb-dependiente por inhibición del complejo TSC1/2, GTPasa de Rheb. La insulina o IGF-1 se unen al receptor de membrana que activa PIK3C1 generando PI(3,4,5)P3 y PI(3,4)P2 que activan PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*) y esta a su vez Akt, que inhibe el complejo TSC1/2. El estrés energético se refleja en una mayor ratio AMP/ATP, que aumenta la actividad de AMPK. Ésta inhibe mTORC1 al fosforilar RAPTOR en S792 y TSC2 en S1387. Condiciones patológicas, como hipoxia o daño en el ADN, son situaciones de estrés que también modulan mTORC1 por AMPK y/o TSC1/2.

[illegible]

3.1.2. Regulación por debajo de mTORC1 (*downstream*): Autofagia

mTORC1 interviene en la regulación de multitud de procesos celulares, entre ellos la autofagia (Fig v) (Meijer et al., 2015):

- mTORC1 fosforila ULK1/2 y ATG13 disociando e inactivando el complejo inductor de autofagia ULK.
- mTORC1 fosforila ATG14 y UVRAG inactivando el complejo PI3KCIII en el inicio y maduración de los autofagosomas (Nakamura and Yoshimori, 2017).
- mTORC1 fosforila el factor de transcripción TFEB, involucrado en la síntesis de ATGs y de proteínas lisosomales, previniendo su translocación al núcleo.

Todo esto hace que la inhibición de mTORC1 sea el método más empleado en la bibliografía para la inducción de autofagia, principalmente con Rapamicina (Rapa). No obstante, la reactivación de mTOR, al finalizar la degradación por autofagia, es necesaria para la regeneración lisosomal (Yu et al., 2010; Munson et al., 2015; Borland and Vilhardt, 2017).

Otras proteínas de la ruta también intervienen en la regulación de autofagia, como Akt que inhibe por fosforilación directa a los factores de transcripción proautofágicos TFEB (Palmieri et al., 2017) y FoxO3 (*forkhead box protein O3*) (Mammucari et al., 2007) (Fig v), así como a AMPK- α 1 (Hawley et al., 2014) y Beclin-1 (Wang et al., 2012). Además, PI3K1 sintetiza PI(3,4,5)P3 y PI(3,4)P2 inhibiendo autofagia al competir con PI(3)P.

3.1.3. Disfunción de la vía y su implicación en Alzheimer

Se ha descrito una hiperactivación de mTORC1 tanto en modelos de envejecimiento como de la enfermedad de Alzheimer (Caccamo et al., 2011; Laplante and Sabatini, 2012). De hecho, la disminución de la actividad de mTORC1 por restricción calórica o por inhibidores químicos ha resultado en el aumento de esperanza de vida y en la disminución de patologías asociadas al envejecimiento (Laplante and Sabatini, 2012). Este fenómeno parece estar mediado por diversas dianas de mTORC1, estando implicados procesos de síntesis proteica y autofagia.

Diferentes estudios en modelos de la EA señalan que la hiperactivación de mTOR parece ser causada por A β , provocando una menor autofagia y la hiperfosforilación de tau. Esto a su vez contribuye a la mayor acumulación A β y tau, y por tanto a los defectos cognitivos tempranos en la EA (Caccamo et al., 2010; Caccamo et al., 2011). Así, la inhibición de la vía de mTORC1, por diferentes estrategias en varios modelos murinos de EA, redujo los niveles tanto de A β como de Tau hiperfosforilado, y generó un rescate de los déficits cognitivos. Se observó una correlación con un aumento de marcadores autofágicos pero también una recuperación a niveles fisiológicos de la expresión génica (Caccamo et al., 2010; Caccamo et al., 2014; Caccamo et al., 2015). En particular, estos efectos se han reproducido con el inhibidor de mTORC1 Rapamicina. Esto, junto con otros efectos neuroprotectores y el hecho de que esté aprobada para su uso en humanos desde 1999, hace de la Rapamicina un interesante candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Richardson et al., 2015).

No obstante, otros grupos sugieren que oligómeros de A β 42 desencadenan una inhibición de mTORC1, a través de la activación de AMPK, generando un bloqueo traduccional en el retículo endoplasmático que activa JNK3 (*c-Jun N-terminal Kinase*), y éste a su vez fosforila APP en T688 facilitando su endocitosis y procesamiento amiloidogénico (Yoon et al., 2012).

3.2. AMPK

La AMPK es un complejo heterotrimérico con actividad quinasa de serinas y treoninas; compuesta por tres subunidades (Jeon, 2016): la subunidad catalítica alfa (α -1 o α -2 en mamíferos), y dos subunidades reguladoras, la beta (β -1 o β -2), y la gamma (γ -1, γ -2 o γ -3). Esto supone un total de 12 combinaciones potenciales para la AMPK en mamíferos, con un patrón de expresión específico de tejido y según las condiciones fisiológicas.

AMPK constituye otro gran nodo central en la regulación del metabolismo celular. El principal papel de la AMPK es estimular la producción de energía a través del metabolismo catabólico de la glucosa y de lípidos, así como inhibir funciones anabólicas que consumen energía como la síntesis de proteínas, ácidos grasos o colesterol (Salminen et al., 2011; Jeon, 2016). Además, la AMPK favorece la adaptación a diferentes estreses como la represión de procesos de inflamación y proliferación celular, mediante la inhibición de NF- κ B, o la renovación de mitocondrias, al eliminar las dañadas por autofagia e inducir la transcripción de genes mitocondriales por la activación de PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*). Sin embargo, estos procesos dependen de una compleja regulación según la naturaleza del tejido y las condiciones fisiológicas.

3.2.1. Regulación por encima de AMPK (*upstream*)

Los principales mecanismos de activación de la AMPK son (Fig v):

- La unión alostérica de AMP o ADP a la subunidad γ . La unión competitiva de ATP impide la activación por este mecanismo, por lo que se considera la AMPK como un sensor directo de la relación [AMP][ADP]/[ATP].
- La fosforilación de la subunidad α en T172 por al menos tres quinasas (LKB1, *Liver kinase B1*; CaMKK2, *Calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2*; y TAK1, *TGF-beta-activated kinase-1*). Esta fosforilación puede eliminarse por la acción de las fosfatasas PP2A, PP2C (*protein phosphatase 2C*) o PPM1E (*Mg²⁺-/Mn²⁺-dependent protein phosphatase*), que pueden acceder fácilmente en condiciones de alta energía (bajo ratio [AMP][ADP]/[ATP]), pero no cuando AMP o ADP se encuentran unidos a la subunidad γ .

Además, la AMPK está altamente regulada por otras modificaciones postraduccionales específicas de cada subunidad e isómero, como ubiquitinación, fosforilación, sumoilación, oxidación/reducción, miristoilación o unión de glucógeno.

3.2.2. Regulación por debajo de AMPK (*downstream*): Autofagia

La AMPK juega un papel doble en este proceso (Fig v) (Kim et al., 2011). Por un lado, AMPK activa fosforila Raptor en S792 y TSC2 en S1387, lo que provoca la inhibición del complejo mTORC1, el cual no puede realizar la fosforilación represiva de ULK1 en S757. Además, AMPK fosforila ULK1, en Ser 555 entre otras, lo que permite la activación del complejo ULK1-Atg13-FIP200 que interviene en la inducción de autofagia.

Por otro lado, AMPK fosforila PIK3C3/Vps34 inhibiendo la constitución de complejos “no autofágicos”, y por lo tanto disminuyendo los niveles de PI(3)P totales en la célula. No obstante, la unión de ATG14 o UVRAG a PIK3C3/Vps34 y Beclin-1, formando el complejo PI3KCIII, genera un cambio conformacional de los mismos que previene la fosforilación inhibitoria de PIK3C3/Vps34 y favorece la fosforilación pro-autofágica de Beclin-1 por AMPK en dicho complejo (Kim et al., 2013) (Fig v).

3.2.3. Disfunción de la vía y su implicación en Alzheimer

En el cerebro, las subunidades de AMPK se están sintetizando constantemente en neuronas, principalmente α -2, β -1 y γ -1, mientras que los astrocitos sólo las expresan al activarse (Salminen et al., 2011). En neuronas, los procesos de despolarización y la activación de receptores ionotrópicos de glutamato generan un aumento de Ca^{2+} intracelular (Mairet-Coello and Polleux, 2014). Puesto que la CaMKK2 se expresa principalmente en el sistema nervioso central, dichos aumentos de Ca^{2+} activan AMPK, monitorizando así cambios en la actividad neuronal, además de los metabólicos.

La enfermedad de Alzheimer está asociada con diversos defectos del metabolismo energético en neuronas, que sugieren la implicación de una alteración en la señalización de AMPK, como disfunciones mitocondriales y en autofagia, alteraciones de la homeostasis de Ca^{2+} , o defectos en el metabolismo del colesterol y de la glucosa (Salminen et al., 2011). Además, se ha descrito que el incremento en inflamación crónica asociado a la edad disminuye la actividad de AMPK en diferentes tejidos, siendo un efecto común tanto a la EA como a desórdenes metabólicos (Salminen et al., 2011; Jeon, 2016).

Así, se piensa que la activación de AMPK puede tener diversos efectos beneficiosos ante diversas condiciones patológicas al inducir la expresión de proteínas antioxidantes, promover diversos efectos anti-inflamatorios o inducir autofagia (Jeon, 2016). En modelos de la enfermedad de Alzheimer, varios grupos han descrito un efecto anti-amiloidogénico de la activación de AMPK, bien por una disminución en el procesamiento amiloidogénico de APP, o bien por una mayor degradación de los niveles de $\text{A}\beta$ intracelulares por inducción de autofagia, revisado en (Salminen et al., 2011; Liu and Chern, 2015). No obstante, existe cierta controversia en cuanto al efecto de AMPK sobre la fosforilación de tau, ya que AMPK puede fosforilar tau en determinados epítomos directamente, pero también es capaz de reducir su hiperfosforilación y agregación al inhibir GSK3 β y activar SIRT1 (*Sirtuin, silent mating type information regulation 2 homolog 1*) (Salminen et al., 2011). Además, también se ha descrito una activación de CaMKK2-AMPK por oligómeros de $\text{A}\beta$, al aumentar los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en sinapsis o al dañar la respiración mitocondrial (Mairet-Coello and Polleux, 2014).

3.3. Modulación de autofagia dependiente de AMPK/mTORC1

Para estudiar la inducción de autofagia dependiente de AMPK/mTORC1 se puede activar la vía por una privación de nutrientes como respuesta celular fisiológica al ayuno. No obstante, existen diferentes compuestos químicos moduladores de dichas quinasas que facilitan el análisis de la implicación de cada vía en el proceso. Así, presumiblemente, la inhibición de mTORC1 y/o activación de AMPK promoverá el flujo autofágico, mientras que lo contrario generará la disminución de dicho proceso. En este proyecto se utilizaron algunos de los fármacos más comunes descritos en la bibliografía (Fig v):

Inhibidores de mTORC1:

- Rapamicina (Rapa): también conocida como sirolimus, es un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, que se une específicamente a FKBP12 (*FK506 binding protein*) inhibiendo mTORC1. Tratamientos prolongados con Rapamicina también disminuyen la señalización por mTORC2 al impedir la formación de complejos *de novo* por su unión a mTOR recién sintetizado (Saxton and Sabatini, 2017).

Moduladores de AMPK:

- 2-desoxi-D-glucosa (2DG) es reconocida por los transportadores de glucosa, al ser un análogo de la misma, que la internalizan en la célula. Al tener el radical 2-hidroxilo sustituido por un hidrógeno es incapaz de entrar en la ruta de la glicólisis. Por lo tanto, la 2DG simula una falta de glucosa en la célula disminuyendo los niveles de ATP, lo que activa la AMPK (Zhang et al., 2014).
- Metformina (Metf) es una biguanida que inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que disminuye la producción de ATP y aumenta la ratio [AMP]/[ATP], activando AMPK (Podhorecka et al., 2017). Se emplea como tratamiento frente a la diabetes mellitus tipo II.
- AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido) una vez que entra en la célula, es fosforilada para generar ZMP (*AICAR monophosphate*), análogo a AMP, activando alostéricamente AMPK (Corton et al., 1995). En clínica se ha empleado para proteger frente a la isquemia cardiaca.
- Dorsomorphin, conocido como Compuesto C (CoC), fue identificado como un inhibidor competitivo de AMPK potente, selectivo y reversible (Zhou et al., 2001).

3.4. Inducción de autofagia independiente de AMPK/mTORC1

3.4.1. Respuesta a estrés por activación de calpaína o JNK

Se han descrito vías de inducción de autofagia independientes de mTORC1 y AMPK. Entre ellas encontramos las rutas de señalización Ca^{2+} /calpaína y cAMP/Epac/PLC ϵ /IP $_3$ (AMP cíclico/ *Exchange protein activated by cAMP/ phospholipase C-epsilon/ inositol trifosfato*), así como JNK1/Beclin-1/PIK3C3 (Li et al., 2017).

Se ha descrito una regulación mutua entre la vía cAMP/Epac/PLC ϵ /IP $_3$ y la vía Ca^{2+} /calpaína/Gs α (Fig vi) (Sarkar et al., 2009). Esto genera una señalización cíclica, cuya inhibición en diferentes puntos genera una inducción de autofagia mTORC1 independiente. De esta manera, incrementos citoplasmáticos de Ca^{2+} , característicos en procesos de excitotoxicidad, tienen un efecto

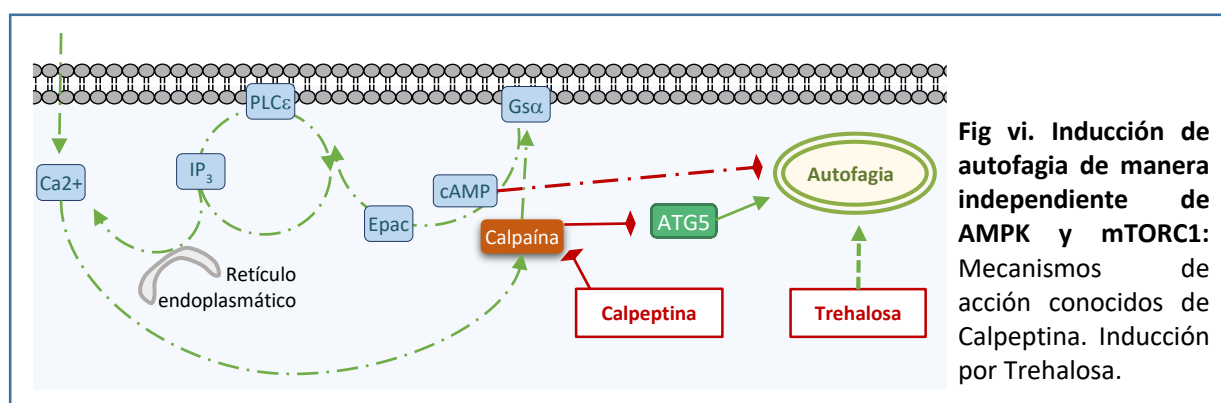
inhibidor de autofagia por esta vía al activar calpaínas, aparte de la activación pro-autofágica de CaMKK2/AMPK. Así, un ejemplo de inductor de autofagia por esta vía es el inhibidor de calpaínas Calpeptina, empleado en este proyecto. Además, la calpaína parece ser el nexo entre esta vía y autofagia, ya que es capaz de proteolizar ATG5 inhibiendo su iniciación (Xia et al., 2010), y su bloqueo con Calpeptina es suficiente para revertir la inhibición de autofagia por cAMP (Mestre and Colombo, 2012) (Fig vi).

Por otro lado, la activación de JNK1 por estímulos como estrés oxidativo presenta un efecto inductor de autofagia por diferentes mecanismos (Zhou et al., 2015). JNK fosforila Bcl-2 favoreciendo la disponibilidad de Beclin-1 para la formación del complejo de iniciación PI3KCIII. Además, JNK fosforila los factores de transcripción FoxO, c-Jun y c-Fos favoreciendo la expresión de genes implicados en autofagia como distintos ATGs, LC3B o PIK3C3/Vps34.

3.4.2. Inducción de autofagia por disacáridos: Trehalosa

La Trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa con un enlace alfa,alfa (1-1) glucosídico (α -D-glucopiranosil (1-1) α -D-glucopiranosido) (Sarkar and Rubinsztein, 2008). Al ser un azúcar no reductor, no es fácilmente hidrolizado por ácidos o por glucosidasas, siendo altamente resistente en organismos carentes de la enzima trehalasa, como en células de mamífero. La Trehalosa se sintetiza en bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas, pero no en mamíferos.

La Trehalosa mostró tener importantes funciones neuroprotectoras como potente inductor de autofagia independiente de mTORC1 (Sarkar et al., 2007; Aguib et al., 2009; Yang and Yu, 2009; Schaeffer et al., 2012) (Fig vi). Si bien no existe un consenso generalizado en el mecanismo de inducción de autofagia por Trehalosa, algunos grupos sí han propuesto algunos modelos en el último año (DeBosch et al., 2016; Mardones et al., 2016; Mayer et al., 2016; Palmieri et al., 2017). Además, la Trehalosa previene la desnaturalización proteica por uniones directas, protegiendo a las células de diversos estreses medioambientales, por lo que se considera una “chaperona química” (Liu et al., 2005b; Sarkar and Rubinsztein, 2008). Estas propiedades hacen de la Trehalosa una potencial estrategia terapéutica para proteinopatías como Alzheimer.



OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo general estudiar el papel de diferentes rutas de señalización en la modulación de autofagia en neuronas y su repercusión en la enfermedad de Alzheimer, en concreto en la amiloidosis.

La enfermedad de Alzheimer constituye el trastorno neurodegenerativo más común, está considerada una *Proteinopatía*, y se caracteriza histopatológicamente por agregados proteicos del péptido beta-amiloide (A β) que acaba formando las *Placas Seniles*, y de tau hiperfosforilado, que genera ovillos neurofibrilares (*NFTs*). Entre otras características celulares, se ha descrito la acumulación de vesículas autofágicas en neuritas distróficas, lo que sugiere una disfunción progresiva del mecanismo de mantenimiento de la homeostasis proteica, en concreto de la autofagia. Por tanto, la modulación de este proceso para su correcto funcionamiento no solo podría paliar los procesos neurotóxicos derivados de la enfermedad, sino también actuar como agente terapéutico fomentando la eliminación de los depósitos proteicos causantes de la misma.

Para el desarrollo del trabajo, elegimos el ratón doble transgénico B6.Cg-Tg(APP^{Swe}, PSEN1^{dE9})/J (al que nos referimos como APP/PS1) como modelo de amiloidosis de la patología de Alzheimer. A partir de él, quisimos determinar el efecto *in vivo* de diferentes inductores de autofagia anteriormente descritos en la bibliografía. Además, quisimos caracterizar el efecto de estos compuestos de forma específica en neuronas, cuya naturaleza postmitótica y altamente polarizada requiere un exhaustivo control metabólico, difiriendo en gran medida de otros linajes celulares empleados comúnmente para el estudio de los mecanismos reguladores de autofagia. Debido a las posibles particularidades existentes en neuronas, exploramos diferentes rutas de señalización que se han descrito implicadas en la inducción de autofagia, al menos en células tumorales.

Por tanto, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar el efecto *in vivo* de compuestos descritos como inductores de autofagia en ratones adultos transgénicos APP/PS1: acceso a cerebro y modulación de la amiloidogénesis.
2. Analizar el efecto *ex vivo* de compuestos descritos como moduladores de autofagia y su posible correlación con una respuesta amiloidogénica de neuronas en cultivo, aisladas a partir de ratones transgénicos APP/PS1 y de sus hermanos de camada *wild-type*.
3. Caracterización molecular de las vías de señalización implicados en autofagia en sistemas neuronales:
 - a. Análisis de la autofagia dependiente de mTORC1.
 - b. Análisis de la modulación de la autofagia por AMPK.
4. Inducción de autofagia independiente de mTOR1 en neuronas: Análisis del efecto del disacárido Trehalosa.
 - a. Análisis de la amiloidogénesis en ratones transgénicos APP/PS1 *in vivo* y *ex vivo* en neuronas, tras la administración de Trehalosa.
 - b. Caracterización de la respuesta celular y molecular en neuronas tras el tratamiento con Trehalosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manipulación de Ratones:

Se ha empleado la línea murina doble transgénica B6.Cg-Tg (APPSwe, PSEN1dE9)/J que expresa los genes humanos APP con la mutación sueca y Presenilina 1 delecionada en el exón 9 (Jankowsky et al., 2001). Nos referiremos a estos ratones como APP/PS1. Estos ratones fueron obtenidos de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA; stock no. 005864) y fueron mantenidos en heterocigosis con ratones *wild type* de igual fondo genético (C57BL/6J). La manipulación y los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo los protocolos y legislación vigente (RD 53/2013; Directiva 2010/63/EU), con la aprobación específica del Comité de Bioética y Protección Animal de la CAM (REF PROEX 341/15).

1.1. Genotipado de Ratones:

Para la extracción de ADN de ratón, se partió de una pequeña sección de 2 mm de la cola de crías de 2-3 días de vida (Postnatal 2-3, P2-P3). El tejido se incubó 2h en agitación (1000 rpm) a 60°C con 500ul de buffer de lisis (100 mM Tris HCl pH 8; 5 mM EDTA; 0,1 % SDS; 1 M NaCl; 80 ug/ml Proteinasa K) y se centrifugó 5 min 13000 rpm 4°C. El sobrenadante se incubó con 200 ul de *Protein Precipitation Solution* (Qiagen) en hielo 5 min, se centrifugó 5 min 13000 rpm 4°C y el sobrenadante obtenido se incubó con el mismo volumen de isopropanol 100 % 30 min a -20°C. Se centrifugó 20 min a 13000 rpm 4°C y el pellet se incubó 30 min a -20°C con 500 ul de etanol 70 % preenfriado. Tras retirar el etanol y esperar a que se termine de evaporar, el pellet se resuspendió en 30 ul de H₂O MilliQ, se incubó 10 min a 65°C para inactivar las DNasas y se guardó a 4°C. Se determinó la cantidad y calidad de ADN de cada muestra en Nanodrop ND-1000 previamente a la PCR.

El genotipado de ratón se determinó por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como se describió anteriormente (Jankowsky et al., 2001). Se obtuvieron tres productos de PCR correspondientes a los genes transgénicos APP y PS1, y al control interno proteína priónica (PrP) presente tanto en transgénicos como *wild type*. Los *primers* empleados fueron:

- Un *primer* antisentido frente a la secuencia contenida dentro de PrP (5': GTG GAT ACC CCC TCC CCC AGC CTA GAC C).
- Un *primer* sense específico de cada transgen (PS1: 5': CAG GTG GTG GAG CAA GAT G; APP: 5': CCG AGA TCT CTG AAG TGA AGA TGG ATG).
- Un sense primer específico del PrP genómico (5': CCT CTT TGT GAC TAT GTG GAC TGA TGT CGG).

La reacción de PCR se realizó empleando el kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). La solución de PCR se compuso de 1x Colorless GoTaq® Flexi Buffer; 2,5mM MgCl₂; 0,2mM dNTPs (Invitrogen); 0,1uM de primer APP-sense; 0,1uM de primer PS1-sense; 0,2uM de primer PrP-sense; 0,2uM de primer PrP-anti; y 1 U GoTaq® DNA Polymerase. El programa de PCR consistió en un paso de iniciación de 94°C 3 min; seguido de 39 ciclos de 94°C/1,5 min, 60°C/1 min y 72°C/1,5 min; y finalmente 72°C/4 min. La mezcla se mantuvo a 10°C hasta parar la reacción y se guardó a 4°C. El resultado de la PCR se visualizó corriendo las muestras con Buffer 6x (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xylene cyanol; 60% glicerol; 50mM Tris pH 7.6) en un gel de agarosa al 1% junto con el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). En todos los casos, wt y transgénico, se observó una banda de 750 bp correspondiente al PrP genómico que se empleó como control interno para comprobar la integridad del ADN extraído. En las muestras procedentes de ratones transgénicos, además se observó una banda de 1300 pb correspondiente al transgén PS1 y una de 400 pb del transgén APP.

1.2. Ensayos in vivo:

Para disminuir la variabilidad en la medida de lo posible, empleamos ratones del mismo sexo y edad. Además, antes del experimento obtuvimos una muestra de sangre de cada individuo y determinamos mediante ELISA los niveles de A β 40 para distribuirlos en dos grupos homogéneos. Los experimentos duraron meses con el fin de observar diferencias significativas en los niveles cerebrales de A β . Se monitorizó el peso de los ratones semanalmente. El sacrificio de los animales se realizó en atmósfera de CO₂. Se extrajo el cerebro para su análisis, un hemisferio se fijó en PFA4% para cortes histológicos y el otro se fraccionó para diferentes análisis. La corteza prefrontal se empleó para ELISA, mientras que el resto de la corteza se separó para su análisis por western blot. También se aislaron el hipocampo y el cerebelo para futuros estudios.

Administración de Rapamicina a ratones: Se administró cada 48h intraperitonealmente una dosis de 5mg Rapamicina/Kg de ratón. Debido a la hidrofobicidad del compuesto, empleamos una formulación anteriormente descrita en la bibliografía (Hartman et al., 2012). Brevemente, se partió de una solución STOCK de 20mg de Rapamicina por mililitro de etanol, y en el día de uso se preparó la dosis deseada en una solución vehículo de 5% polietilenglicol (PEG 400; Fluka®) y 5% Tween® 80 (Sigma®) en PBS. Al grupo control se le administró la misma solución sin Rapamicina.

Administración de Trehalosa a ratones: Se administró *ad libitum* una solución de Trehalosa al 2% en el agua de bebida. Al tratarse de un disacárido, decidimos emplear un 2% de Sacarosa en el grupo control para descartar efectos que pudieran derivarse de posibles cambios en el peso corporal o de la modificación de los niveles de glucosa en sangre. Empleamos ratonas hembra de la misma edad. Con el fin de prevenir el propenso crecimiento de contaminaciones microbianas, tratamos de mantener la esterilidad en la medida de lo posible cambiando los biberones dos veces por semana con las soluciones filtradas en campanas de flujo laminar.

2. Muestras de cerebros de pacientes de Alzheimer.

Las muestras de los pacientes de AD fueron proporcionadas por el Dr. **Isidro Ferrer**, director del Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge, y coordinador del Banco de Cerebros de esa Institución. Para este estudio hemos usado fragmentos de hipocampo de los estadios de Braak.

3. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares se crecieron a 37°C y 5 % CO₂ en DMEM completo: medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma®), 4 mM glutamina, 100 U/ml penicilina G y 0,1% mg/ml estreptomycin (PAN Biotech). El FBS fue previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, y filtrado.

Para los pases celulares, se partió de placas con un 80-85 % de confluencia celular, se hizo un lavado con solución PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) y se incubó en 0,25% Tripsina (BD Difco™) - 0,02% EDTA (Calbiochem®) hasta que las células comenzaron a desprenderse, momento en el cual se resuspendieron en DMEM completo, y se centrifugaron a 1200 rpm 5 min. La dilución y frecuencia de subcultivo dependió de la línea celular empleada.

Líneas celulares empleadas:

- SH-SY5Y (número ATCC® CRL-2266): Consiste en una línea derivada de neuroblastoma humano, con una porción flotante y otra adherente (empleamos esta última). Estas células prefieren crecer en pequeños grupos y presentan una forma de huso con múltiples procesos celulares cortos y finos similares a neuritas. Debido a su alta sensibilidad a la manipulación, se suplementó el medio con HEPES 15 mM (Sigma®) para evitar alteraciones del pH. Además, se realizaron pases cortos (1:3-1:5) con TrypLE™ (Gibco™), en vez de tripsina, a 1000 rpm 5 min, con una frecuencia de 2 veces por semana.
- HEK-293T (número ATCC® CRL-1573): es una línea derivada de epitelio de riñón de embrión humano HEK293 (Human Epithelial Kidney 293) que tiene insertado el gen sensible a temperatura para el antígeno SV40T (Simian Vacuolating Virus 40 Tag). Estas células presentan una morfología epitelial y un crecimiento adherente. Se empleó una frecuencia de subcultivo de 2 veces por semana con diluciones de 1:20 a 1:40. Debido a su alta eficiencia de transfección, esta línea fue utilizada para el empaquetamiento de vectores lentivirales.

Mantenimiento de Líneas Celulares:

Para el almacenamiento y mantenimiento de líneas celulares se procedió a su congelación en nitrógeno líquido. Para ello, se procedió de manera análoga al subcultivo celular y se resuspendieron las células en DMEM suplementado con 20 % FBS y 10 % DMSO en criotubos que a su vez se enfriaron progresivamente en Mr. Frosty™ (NALGENE) a -75°C previamente a su almacenamiento en nitrógeno líquido. La descongelación de las líneas celulares se realizó a 37°C, eliminando el exceso de DMSO por dilución en DMEM completo y centrifugación, de manera análoga al pase celular.

Como norma general, la manipulación de los cultivos celulares se realizó de rutina en cabina de clase II en nivel de bioseguridad 2.

4. Cultivo Primario de Neuronas Granulares de Cerebelo

Se realizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGN, *Cerebellar Granule Neurons*) a partir de ratones wt o transgénicos de 5, 6 ó 7 días de vida (Postnatal P5, P6 ó P7). Tras sacrificar a las crías, se aislaron los cerebelos y se quitaron las meninges en HBSS 1X frío (Hank's Balanced Salted Solution) suplementado con 3% BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche) y 1,2mM MgCl₂. Basándonos en el protocolo descrito por Kaech y Banker (2006) (Kaech and Banker, 2006), troceamos los cerebelos con una cuchilla, lavamos dos veces con HBSS 1x suplementado e incubamos el tejido con tripsina (HBSS1x suplementado; 0,6 mg/ml DNasa-I (Roche); Tripsina 0,2% (Sigma®) a 37°C durante 15 min. Se retiró la tripsina y se inactivó la restante con un lavado de HBSS-FBS-DNasa (HBSS 1x; 20% FBS; 0,2 mg/ml DNasa I y 2,4 mM MgCl₂) y se centrifugó 3 min a 800 rpm. El pellet se resuspendió en 2 ml de HBSS-FBS-DNasa con dos pipetas de vidrio de diferente grosor en la punta para terminar de disociar las neuronas. Se dejó sedimentar los restos y el sobrenadante con las neuronas disociadas se pasó a otro falcon. Se cuantificaron las neuronas vivas en una cámara de Neubauer (Brand) mientras se centrifugaban el resto a 800 rpm para eliminar el exceso de FBS. Se resuspendieron las células a la dilución deseada en medio NB-K (Neurobasal sin Glutamina (Gibco®); 2

mM GlutaMAX™ (Gibco™); 0,01 % estreptomicina (Pan Biotech); 100 U/ml Penicilina G (Pan Biotech), 22 mM KCl). Se sembraron $1,5 \cdot 10^6$ CGN por pocillo de placas *multiwell* M6 para obtener extractos para western blot; y 10^5 CGN por pocillo de placas *multiwell* M24 para la obtención de sobrenadantes para ELISA, ensayos de viabilidad o sobre cristales para inmunofluorescencia. Estas placas fueron tratadas previamente con 10 ug/ml de Poli-L-Lys (Sigma®) durante 24h aproximadamente y lavadas con agua MilliQ. Los cristales para inmunofluorescencia se incubaron análogamente con 50 ug/ml de Poli-L-Lys.

5. Tratamientos administrados a los cultivos celulares:

Los tratamientos realizados oscilan entre las 48h, 24h y 4h según la finalidad y toxicidad de los mismos. En el caso de los cultivos primarios de CGN, los experimentos siempre se pararon a DIV 4 (4 *Days In Vitro*), de tal manera que la administración del tratamiento se realizó en el momento correspondiente respecto a ese estadio. Los tratamientos utilizados fueron: Rapamicina (Rapa; Rapamycin, LC Laboratories®), Bafilomicina A1 (BafA1; Bafilomycin A1, Santa Cruz Biotech.), MG132 (Tocris®), Cloroquina (CQ; Sigma®), NH₄Cl (Merck®), Calpeptina (Calp; Calbiochem®), 2-desoxi-D-glucosa (2DG; Sigma®), Metformina (Metf; Metformin, Calbiochem®), AICAR (AICA-Riboside, Calbiochem®), Compuesto C (CoC; Dorsomorphin dihydrochloride, Tocris®), Q-VD-OPH (QVD; Calbiochem®), 3-Metiladenina (3MA; Sigma®), Wortmanina (Wort; Sigma®), VPS34-IN1 (IN1; (Bago et al., 2014)), Spautin-1 (SP; Calbiochem®), MRT68921 (MRT; (Petherick et al., 2015)), Trehalosa (Treh; D-(+)-Trehalose Dihydrate, amsbio), Sacarosa (Sac; Merck®), Pepstatina-A (PepstA; Enzo®), Ácido okadaico (Ok Acid; Calbiochem®), Ciclosporina A (CsA; Sandimmune Neoral, Novartis). Como control se empleó el solvente correspondiente, agua MilliQ, etanol (Merck®) o DMSO (Dimethyl Sulfoxide; AppliChem).

6. Transformación de cultivos celulares

Se realizaron diferentes procedimientos según el formato del plásmido con el inserto de interés y la naturaleza de las células a transformar.

6.1. Transfección de DNA

Para la transfección de células de linaje neuronal (SH-SY5Y) empleamos Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™). Por cada P100 con células al 70% de confluencia, hicimos por un lado la solución A con 1ml de Opti-MEM® (Gibco®, Invitrogen™) y 24ug de DNA. Por otro lado, preparamos la solución B con 1ml de Opti-MEM® y 40ul de Lipofectamine® 2000. Tras 5min de incubación a RT, juntamos las dos soluciones e incubamos otros 20min. Mientras, lavamos las células con PBS1x y las cubrimos con 4ml de Opti-MEM®. Añadimos la mezcla A+B a las células y las mantuvimos 6h en el incubador a 37°C 5%CO₂. Seguidamente, cambiamos el medio al empleado en dichas células, DMEM completo con HEPES. Entre las 48h-72h posteriores a la transfección, realizamos el experimento.

6.2. Infección con vectores lentivirales

Para una mayor eficiencia en la transformación de células de naturaleza neuronal, empleamos la infección con vectores lentivirales.

Empaquetamiento de vectores en lentivirus:

Para la fabricación de partículas lentivirales (LV) con nuestro vector de interés, se siguió el protocolo descrito por Naldini et al. (Naldini et al., 1996) con los reactivos Lipofectamine® y PLUS™ (Invitrogen™). Brevemente, se partió de un cultivo de HEK293T al 70% de confluencia para hacer la transfección conjunta de tres plásmidos imprescindibles para la constitución de la partícula viral:

- Vector LV-1: PM2D.G, codifica la proteína VSV-G de la cubierta del virus
- Vector LV-2: pCMVΔR8.2, codifica todas las proteínas víricas a excepción de la cubierta
- Vector LV-3: codifica nuestro gen de interés

Por cada P100 se preparó por un lado la solución A con 750ul de Optimem (Gibco), 12ug de DNA total (3ug pCMAR, 3ug PM2DG, 6ug del vector de interés) y 24ul Plus Reagent (Invitrogen). Por otro lado, se preparó la solución B con 750ul Optimem y 36ul Lipofectamina. Tras 20 min de incubación a RT se mezclaron las soluciones A y B, y se incubó otros 20 min a RT. Mientras, se lavaron las células con PBS1x y se les añadió 4 ml de Optimem atemperado. Se añadió la mezcla A+B a las células y se dejó o/n en el incubador a 37°C 5%CO₂. Al día siguiente, se cambió el medio de la placa por 6ml del medio definitivo que se fuera a utilizar en la infección. 24h más tarde, se recogió el medio con las partículas víricas y se eliminaron los restos celulares con un filtro de 0,45um *Low Binding Protein*. Se alicuoteó y se preservó a -80°C hasta su uso.

La titulación del lentivirus se realizó para cada stock en el tipo celular de estudio (SH-SY5Y o CGN). Para ello se testaron diferentes diluciones en las condiciones de infección y se comprobó su eficiencia por western blot.

Infección de sistemas neuronales con lentivirus:

Brevemente, añadimos el lentivirus con nuestro gen de interés a las células SH-SY5Y a elevada confluencia con polibreno (8ug/ml). Al día siguiente cambiamos el medio y 24h después plaqueamos las células infectadas para el experimento. Durante las 48h-72h post-infección (pi), cuando la expresión génica es máxima, añadimos los tratamientos y paramos el experimento.

En el caso de CGN, para disminuir la toxicidad generada en el procedimiento, se redujo el tiempo de incubación a 6h o se mantuvo a 24h pero sin utilizar polibreno.

Plásmido	inserto	tipo	Procedencia
pM2D.G	cubierta lentiviral (VSV)	Vector LV-1	(Naldini et al., 1996)
pCMVΔR8.2	proteínas virales excepto cubierta	Vector LV-2	(Naldini et al., 1996)
GFP	Proteína GFP	Vector LV-3	Celeris
RhebQ64L	Rheb constitutivo activo	Vector LV-3	(Jiang and Vogt, 2008)
shCo	control de interferencia	Vector LV-3	Sigma
sh40	interferente de Atg5 humano	Vector LV-3	TRCN0000150940; Sigma
sh963	interferente de Atg5 humano	Vector LV-3	TRCN0000151963; Sigma

6.3. Alineamiento de secuencias

Previamente realizamos un alineamiento de secuencias entre el ARN mensajero codificante de la proteína Atg5 humano (NM_004849) o de ratón (NM_053069) y nuestros interferentes Sh40 o Sh963, tal y como indicamos en materiales y métodos. Nos apoyamos en el algoritmo de Needleman-Wunsch del programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) facilitado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para evitar el fraccionamiento de la secuencia codificante de los interferentes, aplicamos parámetros permisivos para fallos de alineamiento (Match/Mismatch Scores: 1,-1) y altamente restrictivos para la existencia y tamaño de huecos (Gap Costs: Existence: 5, Extension: 2). Obtuvimos un alineamiento parcial principal de 18 nucleótidos (nts) con un 100% de identidad entre el interferente Sh40 y los genes tanto de humano como de ratón, por lo que consideramos plausible su uso en células procedentes de ratón. No se tuvo la misma suerte en el caso del interferente Sh963, que presentó un alineamiento parcial principal de 25 nts con una identidad del 92% con el transcrito humano, lo que podría explicar su mayor eficiencia en SH-SY5Y, pero tan solo un 72% de identidad en 18nts de alineamiento parcial principal en el caso del ARN murino.

7. Ensayos de viabilidad celular

Se emplearon tres tipos de ensayos para monitorizar la viabilidad celular. En todos ellos, se sembraron 10^5 células por pocillo de placas M24, recubiertos con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Poli-L-Lys. Se consideró una afectación de la viabilidad celular a partir de un 20% de reducción de marcaje. Tras la administración de los tratamientos, se procedió al ensayo:

- **Ensayo de Calceína/Yoduro de Propidio:** Se añadió al medio 1,5 μM yoduro de propidio (Sigma®) y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calceína (Invitrogen) de concentración final. Tras una incubación de 30 min mínimo, se tomaron fotografías en un microscopio Leica AF6000 con control de temperatura (37°C) y CO₂ (5 %). Se analizaron los resultados con Fiji.
- **Ensayo con azul de Coomassie:** Tras la fijación de las células con PFA 4%, se hicieron 3 lavados con PBS y se incubó 1h a RT con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,2% en 40% metanol/ 10% ácido acético. Se lavó con agua y, una vez seco, se incubó 15 min en NaOH 0,1N en 50% metanol. Se paró la reacción con igual volumen de tricloroacético 10% y se midió la absorbancia a 595nm.
- **Ensayo de MTT:** se lavaron las células con HBSS sin rojo fenol y se incubaron 1h a 37°C 5% CO₂ en 0,5mg/ml MTT en NB sin rojo fenol suplementado con Gmax. Se aspiró la solución y se incubó con DMSO en agitación y oscuridad durante 10 min. Se midió la absorbancia a 550nm.

8. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (western blot)

Según el origen de las muestras para analizar por western-blot, así como su finalidad, se ajustó el protocolo de extracción de proteínas y de electrotransferencia.

8.1. Extracción proteica a partir de cultivos celulares para western blot

Se aspiró el medio y se lavó una vez con PBS para su inmediata congelación en nieve carbónica. Para la lisis, las placas se descongelaron en hielo. Se emplearon dos tipos de buffers de lisis, uno suave con Tritón X100 como detergente no iónico para la obtención de una fracción soluble citoplasmática y una fracción insoluble mayoritariamente nuclear; y otro fuerte con SDS como detergente fuerte para obtener un extracto celular total.

- Extracción con Buffer Tritón X100 (20mM HEPES, 100mM NaCl, 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 5mM EDTA, 1% Tritón X100, 1x *Complete Protease Inhibitor Cocktail* [Roche], 1uM Ácido Okadaico [Calbiochem]). Al ser un detergente suave que no desnaturaliza las proteínas, el extracto se mantuvo en hielo durante todo el proceso para evitar la acción enzimática. Se levantó el extracto proteico en buffer con *Scraper* y se mantuvo en hielo durante 30 min para favorecer la lisis. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm 4°C para separar el sobrenadante con la fracción soluble del pellet con la fracción insoluble. En el caso de querer analizar la composición proteica de la fracción insoluble, se añadió el mismo volumen de buffer SDS y se prosiguió su extracción.
- Extracción con Buffer SDS (50mM Tris pH 7.6, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% SDS). Al ser un detergente fuerte que desnaturaliza las proteínas impidiendo la actividad enzimática, la extracción se realizó a temperatura ambiente con el fin de que no precipite el SDS. Acto seguido, se calentaron las muestras en agitación fuerte (1000 rpm) durante 15 min a 95°C. Se sonicaron 30 seg para romper el ADN evitando su viscosidad, y se centrifugaron 20 min a 13000 rpm para quedarnos con el sobrenadante.

La concentración proteica se determinó usando el *protein assay kit* de Bio-Rad, y los extractos se conservaron a -20°C hasta su uso.

8.2. Extracción proteica de tejido cerebral

Para la preparación de muestras de tejido cerebral para western blot, se empleó el buffer de extracción con tritón X100. Se añadieron 3ul/mg de tejido para su homogeneización con Potter. Tras la lisis en hielo, se centrifugó a 13200 rpm 20 min a 4°C. El sobrenadante se diluyó 10 veces en el mismo buffer para su uso.

8.3. Western blot

Se prepararon muestras de 20 ug de proteínas llevadas a un mismo volumen final, se añadió buffer de carga 5x (325 mM Tris HCl pH 6,8; 10 % SDS; 25 % glicerol; 0,5 % azul de bromofenol; 5% beta-mercaptoetanol) y se hirvieron 5 min a 100°C. Tras hacer un spin, se cargó toda la muestra de 20 ug de proteína en geles de SDS-poliacrilamida (SDS/PAGE) para su electroforesis y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa o PVDF preactivada con metanol. Se bloquearon los blots en 5% BSA durante 1h a temperatura ambiente (Room Temperature, RT) y se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C hasta el día siguiente. Se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-mouse/anti-rabbit IgG-HRP de Santa Cruz Biotech.[®]; anti-rat IgG-HRP de Bethyl Laboratories©) a 1:5000 mínimo 1h a RT y se detectó la señal emitida usando Western Lightning™-ECL (PerkinElmer). Los lavados entre cada paso se realizaron con TBS 1x- 0,1 % Tween 20.

9. Anticuerpos primarios

Tabla 2. Anticuerpos primarios. mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal.

	Anticuerpo	isotipo	dilución		casa comercial	referencia
			western.	inmuno.		
Alzheimer	APP A4 (22C11)	Mouse mAb	1:500	1:500	Millipore	MAB348
	Beta Amyloid, 1-16 (6E10)	Mouse mAb	1:1000	1:500	Covance	SIG-39300
	APP/beta-amiloid (4G8)	Mouse mAb	1:1000		Chemicon	MAB1561
	APP C-term	Rabbit pAb	1:1000		Sigma	A8717
	BACE1	Rabbit mAb	1:1000	1:100	Cell Signaling Tech.	5606
	Tau1	Mouse mAb	1:5000	1:500	Chemicon	3420
	AT100	Mouse mAb	1:200		Thermo Scientific	MN1060
	ADAM10	Rat mAb	1:500		R&D Systems	MAB946
	AT180	Mouse mAb	1:100		Thermo Scientific	MN1040
	AT8	Mouse mAb	1:100		Thermo Scientific	MN1020
	Tau5	Mouse mAb	1:1000		Merk Millipore	577801
	PHF1	Mouse mAb	1:200		donado por P Davies Sift	
degradación	LC3B	Rabbit pAb	1:4000		Sigma	L7543
	Cleaved Caspase-3 (D175)	Rabbit pAb	1:1000	1:100	Cell Signaling Tech.	9661
	Atg5 (ATG5-18)	Mouse mAb	1:1000		Sigma	A2859
	NBR1 (4BR)	Mouse mAb	1:500		Santa Cruz Biotech	sc-130380
	p62/SQSTM1 (2C11)	Mouse mAb	1:4000		Novus Biologicals	H00008878-M01
	Caspase-3	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9662
	PARP-1 (46D11)	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9532
señalización	Lamp1 (sólo ratón)	Rat mAb	1:1000	1:100	DSHB	1D4B
	p-P70 S6K (T389)	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9205
	P70S6K alfa TOTAL	Rabbit pAb	1:500		Santa Cruz Biotech	sc-230
	p-AMPK alfa (T172)	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	2535
	AMPK alfa total	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	5832
	p-Akt (S473)	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9271
	Akt total	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9272
	p-S6 (S240/244)	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	2215
	S6 total	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	2217
	p-GSK3 alfa/beta (Ser21/9)	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9331
	GSK3 alfa total	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	9338
	p-PRAS40 (T246)	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	2997
	p-ACC (S79)	Rabbit pAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	3661
	p-ULK1 (S555)	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	5869
tráfico	PSD95	Rabbit mAb	1:1000		Cell Signaling Tech.	3450
	Sec-8	Mouse mAb	1:1000		BD	610659
	Sec-6 (rSec6, 9H5)	Mouse mAb	1:1000		Enzo/Stressgen	ADI-VAM-SV021
	GM130	Mouse mAb		1:50	BD	610822
	18B11(GIMPt/TGN38)	Rabbit pAb		1:300	donado por I. Sandoval	
control interno	beta-actin	Mouse mAb	1:40000		Sigma	A5441
	GAPDH (14C10)	Rabbit mAb	1:2000		Cell Signaling Tech.	2118
	TUJ1 (beta3 tubulina)	Mouse mAb		1:1000	Santa Cruz Biotech.	sc-58888

10. Inmunocitoquímica

Las células fueron cultivadas a baja densidad en cubres de vidrio. Se fijaron con PFA 4% durante 20 min y se hicieron tres lavados con PBS1x. Se incubó 15 min en NH₄Cl 50mM para eliminar la autofluorescencia celular. Se permeabilizaron las membranas y se bloquearon las uniones inespecíficas al mismo tiempo durante 1h con la solución PGT (PBS1x; Gelatina [*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma®] 0,22%; Tritón X-100 0,1%). Los anticuerpos primarios se incubaron en PGT a 4°C o/n. Los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa Fluor® (1:1000, Molecular Probes), TO-PRO®-3 (1:1000, Molecular Probes) y Faloidina acoplada a Alexa Fluor®647 (1:100, Molecular Probes) se incubaron en PBS1x durante 1h en oscuridad a RT. Seguidamente, en su caso, se incubó con DAPI (1:5000, Calbiochem®) durante 10 min en oscuridad a RT. Entre cada paso se lavó abundantemente con PBS1x. Se eliminó el exceso de sales con agua MilliQ y se dejó secar en oscuridad unos 10min para seguidamente montar los cubres con Fluoromont G (Southern Biotechnology Associates, Inc).

10.1. Colocalización cuantitativa

El análisis de imagen se realizó con el programa Fiji. Empleamos el plugin de ImageJ ICA (*Intensity Correlation Analysis*) para comprobar si existía una relación de dependencia espacial y de intensidad entre dos proteínas marcadas con diferente fluoróforo a partir de imágenes obtenidos por microscopía confocal. Empleamos el coeficiente ICQ (Intensity Correlation Quotient), cuyos valores oscilan entre -0,5 y +0,5. Se obtienen valores positivos ($0 < ICQ < +0,5$) si ambos marcajes varían su intensidad a la par, y negativos ($-0,5 < ICQ < 0$) si lo hacen a la inversa. Por tanto, a diferencia del coeficiente de Pearson, el ICQ nos informa de la exclusión entre proteínas además de la correlación.

11. Cuantificación de A β por ELISA

Se analizaron los niveles de beta-amiloide (A β) con el kit de ELISA frente a A β 40 ó 42 humano de Invitrogen, siguiendo sus instrucciones. La preparación de extractos de tejido cerebral y de medio de cultivo se realizó de acuerdo a las indicaciones del kit. Para la preparación de extractos celulares a partir de cultivos primarios de CGN se empleó una solución de 0,5% Tritón X100 y 2,5mM EDTA en PBS para el lisado durante 30min en hielo, tras lo que se sonicaron las muestras 30 segundos y se centrifugaron a 13200 rpm 10min 4°C para quedarnos con el sobrenadante.

12. Ensayo de endocitosis de A β 40 unido a fluoróforo

Realizamos cultivos de CGN a baja densidad sobre cubres de vidrio. Empleamos el péptido acoplado a fluoróforo *HiLyte™ Fluor 555 labeled A β (1-40)* (A β 555, AnaSpec, Inc). Junto con los tratamientos, administramos el péptido A β 555 a una concentración de 2ug/ml. Tras 4h, lavamos varias veces con PBS 1x para retirar el A β 555 no endocitado y fijamos con PFA 4%. Para evitar la cuantificación del péptido adherido a las superficies, delimitamos el área neuronal marcando la beta-3 tubulina (TUJ1) y obtuvimos imágenes de planos intracelulares por microscopía confocal (LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M Zeiss). Analizamos los resultados con Fiji. En cada imagen, empleamos la intensidad total del A β 555 internalizado referido al área neuronal (A β int. IntDen/Área TUJ1).

13. Ensayo LysoSensor *in vivo*

Realizamos cultivos primarios de CGN a baja densidad en placas P35 con fondo de vidrio de 10mm de diámetro. Tras los tratamientos, añadimos la sonda LysoSensorTM Green DND-189 (Molecular Probes) a una concentración final de 1uM e incubamos las células durante 1h adicional a 37°C 5%CO₂ en oscuridad. Seguidamente, lavamos el exceso de sonda con medio atemperado y realizamos fotos a 100 aumentos en un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) con sistema *in vivo* y acoplado a una cámara CCD monocroma. Analizamos los resultados con Fiji.

14. Ensayo de actividad de la catepsina D

Cultivamos las neuronas a alta densidad ($3 \cdot 10^6$ CGN por P60) y, tras los tratamientos, se resuspendieron seguidamente las células en tampón de lisis ácido (50mM acetato sódico pH 5,5; 0,1M NaCl; 1mM EDTA; 0,2% Tritón X-100), incubamos 1h en hielo y clarificamos el lisado. Empleamos el substrato fluorogénico para catepsina D y E (BML-P145; Enzo Life Sciences). En cada pocillo de una M96 negra se añadieron 30ug de muestra y el substrato D/E a 10uM en un volumen final de 100ul. Tras una incubación de 30 min a 37°C en oscuridad, determinamos la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro TECAN infinite F200 con los filtros de excitación 320 / emisión 400.

15. Microscopía electrónica de transmisión

Se realizaron cultivos de CGN a muy alta densidad ($4 \cdot 10^6$ células por P60). Tras los tratamientos, se añadió el fijador a concentración final PFA 4% + Glutaraldehído 2% en tampón Sörensen (Na/K 0,1M pH7.4) que se mantuvo 2h a RT.

La preparación de las muestras fue llevada a cabo por el servicio de microscopía electrónica del CBM. Brevemente, tras los lavados del fijador, se levantaron las células y se centrifugaron 5min a 2000g RT para la formación de pellets. Se realizó una postfijación con tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 1% durante 1h a 4°C. Tras tres lavados en agua bidestilada, se empleó ácido tánico al 0,15% en tampón Sörensen 1min. Tras varios lavados para eliminar los restos de tampón, se incubó con acetato de uranilo al 2% 1h a 4°C en oscuridad. Tras tres lavados con agua bidestilada, se deshidrataron las muestras a 4°C con concentraciones crecientes de acetona (50, 70, 90 y 100%) durante 10min por incubación. Para la infiltración en la resina epoxi tipo Epon (TAAB 812, TAAB laboratories, England), se incubó a RT en agitación en una mezcla de acetona y resina Epon 3:1 1h y 1:1 o/n. Al día siguiente se incubó en acetona-Epon 1:3 1h, Epon 100% que se renovó a las 6h y a las 24h. Se polimerizaron las muestras a 60°C durante 2 días. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 70nm en un ultramicrotomo ULTRACUT UCT (Leica, Viena) con una cuchilla de diamante DIATOME. Las secciones se recogieron en rejillas de Cu/Pd (100 mesh) cubiertas con Formvar (TAAB laboratories, England) y una capa de carbón evaporado. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 7min y con citrato de plomo de Reynolds durante 2min.

Obtuvimos las imágenes con un microscopio electrónico Jeol JEM-1010 (Jeol, Japan) con un voltaje de aceleración de electrones de 80kV, y una cámara CMOS 4Kx4K, F416 de TVIPS (Gauting, Germany).

16. Análisis estadístico

Los análisis de intensidad de western blot e inmunofluorescencia se realizaron en ImageJ. Se empleó el programa SigmaPlot 12.5. Según el número de variables y grupos experimentales, se eligió el test pertinente y se siguieron las indicaciones del programa según la distribución de los datos, Prueba t de Student o ANOVA. Las diferencias estadísticamente significativas se indicaron según el p-valor como: * para $p \leq 0,05$; ** para $p \leq 0,01$; *** para $p \leq 0,001$. En general, los resultados se representaron en gráficos de barras como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Los resultados derivados del análisis de imágenes se representaron en diagramas de cajas para una mayor representatividad de la mediana y distribución de los datos.

RESULTADOS

1. Análisis comparativo de la alteración de la autofagia descrita en modelos de la patología de Alzheimer.

En primer lugar, quisimos corroborar las anomalías en autofagia ya descritas en la enfermedad de Alzheimer, usando marcadores específicos de esta actividad celular. Para ello, empleamos indicadores como el adaptador P62/SQSTM1 o la conversión LC3I/LC3II, así como el nivel de activación de la vía mTORC1/P70S6K altamente relacionada con su regulación. Procedimos al estudio comparativo de este proceso en extractos de tejido cerebral *post mortem* tanto de pacientes con Alzheimer como del modelo de ratón doble transgénico APP/PS1, que empleamos para el presente trabajo. Asimismo, como modelo neuronal de la enfermedad, analizamos dichos marcadores en cultivos de neuronas realizados a partir de ratones APP/PS1 frente a ratones WT del mismo fondo genético (hermanos de camada).

1.1. Análisis de marcadores de autofagia en tejido cerebral de pacientes con Alzheimer y del modelo murino de la enfermedad APP/PS1.

Analizamos muestras de tejido hipocampal obtenidas de cerebros *post mortem* de pacientes diagnosticados con grados Braak III, IV y V de la EA (Braak and Braak, 1991), y controles de edades similares. Por western blot, examinamos los niveles de proteínas degradadas por autofagia como P62/SQSTM1 (P62), y observamos una acumulación estadísticamente significativa en cerebros de grado V (Fig 1a). Aunque los niveles de LC3II presentaban una tendencia a estar más elevados en todos los grados Braak analizados, no obtuvimos diferencias significativas. Estos datos sugieren una deficiente degradación por autofagia. Los niveles de fosforilación tanto de p-P70S6K(T389) como de su diana p-S6(S240/244) se incrementaban en todos los grados Braak de EA, siendo especialmente significativos en los de grado V, acorde a una mayor activación de la vía mTORC1 (Fig 1a, 1b).

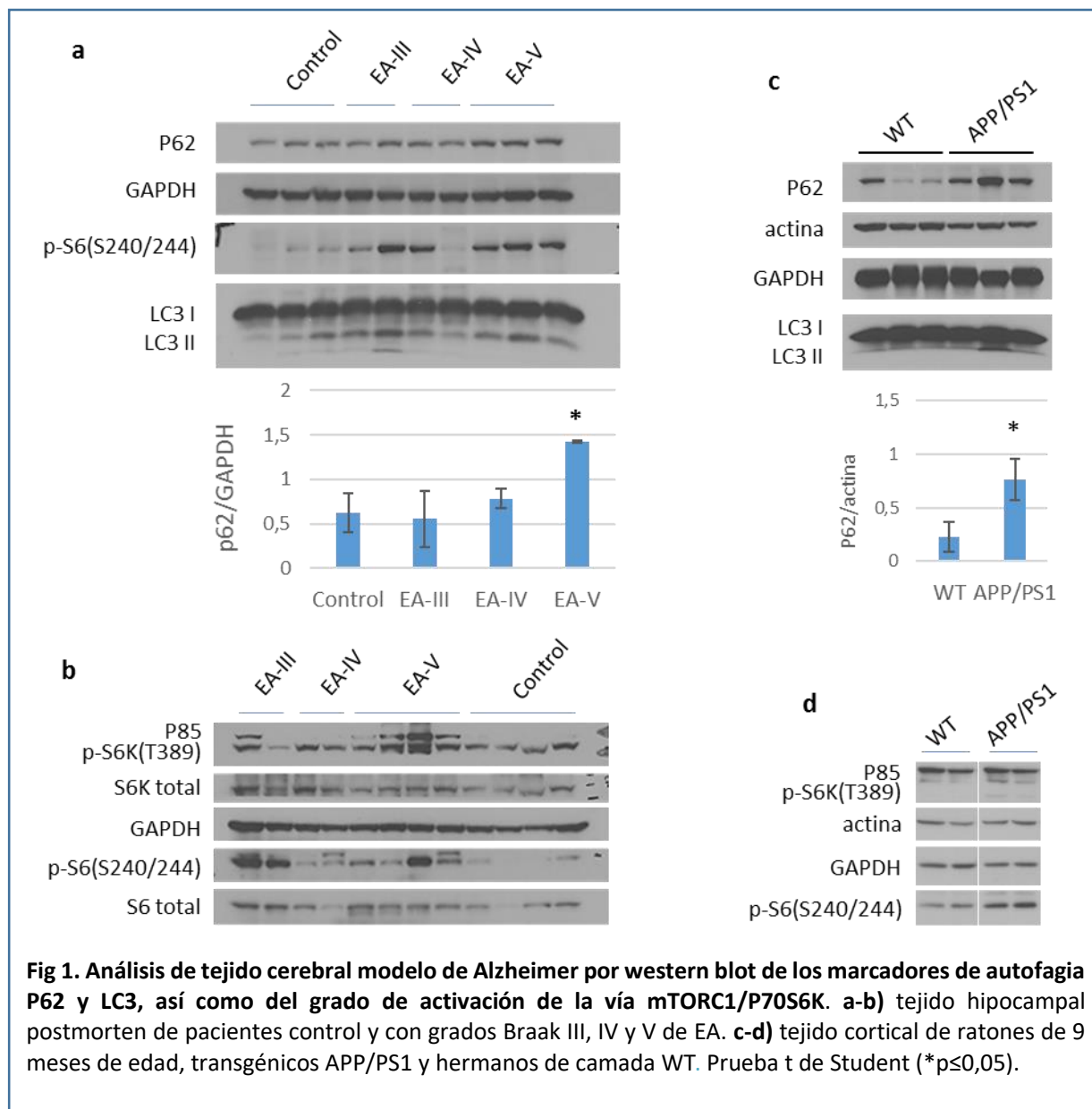
Estos resultados confirman datos previos según los cuales la enfermedad de Alzheimer presenta una hiperactivación en la vía de señalización mTORC1 correlacionada con una acumulación de marcadores autofágicos (Caccamo et al., 2010; Caccamo et al., 2011), lo que en un inicio podría entenderse como algo contradictorio.

Por otro lado, quisimos comprobar si nuestro modelo murino de la EA presentaba una afectación similar de la degradación mediada por autofagia. Preparamos extractos de corteza de ratones APP/PS1 de 9 meses de edad, cuando ya presentan altos niveles de A β en cerebro. Por western blot se observó una acumulación de P62 significativamente mayor en comparación con sus hermanos *wild-type*, mientras que el aumento de LC3II fue más sutil (Fig 1c). Observamos una tendencia, no estadísticamente significativa, a una mayor activación de la ruta mTORC1/P70S6K en los ratones APP/PS1 respecto a sus hermanos *wild-type* (Fig 1d).

1.2. Caracterización de la autofagia basal en sistemas neuronales.

Los datos obtenidos a partir de homogeneizados de tejido cerebral corresponden al conjunto de poblaciones celulares de muy diversa naturaleza, mayoritariamente glial y neuronal (Herculano-Houzel, 2014). Esto imposibilita distinguir cuál es la participación de cada tipo celular en la acumulación

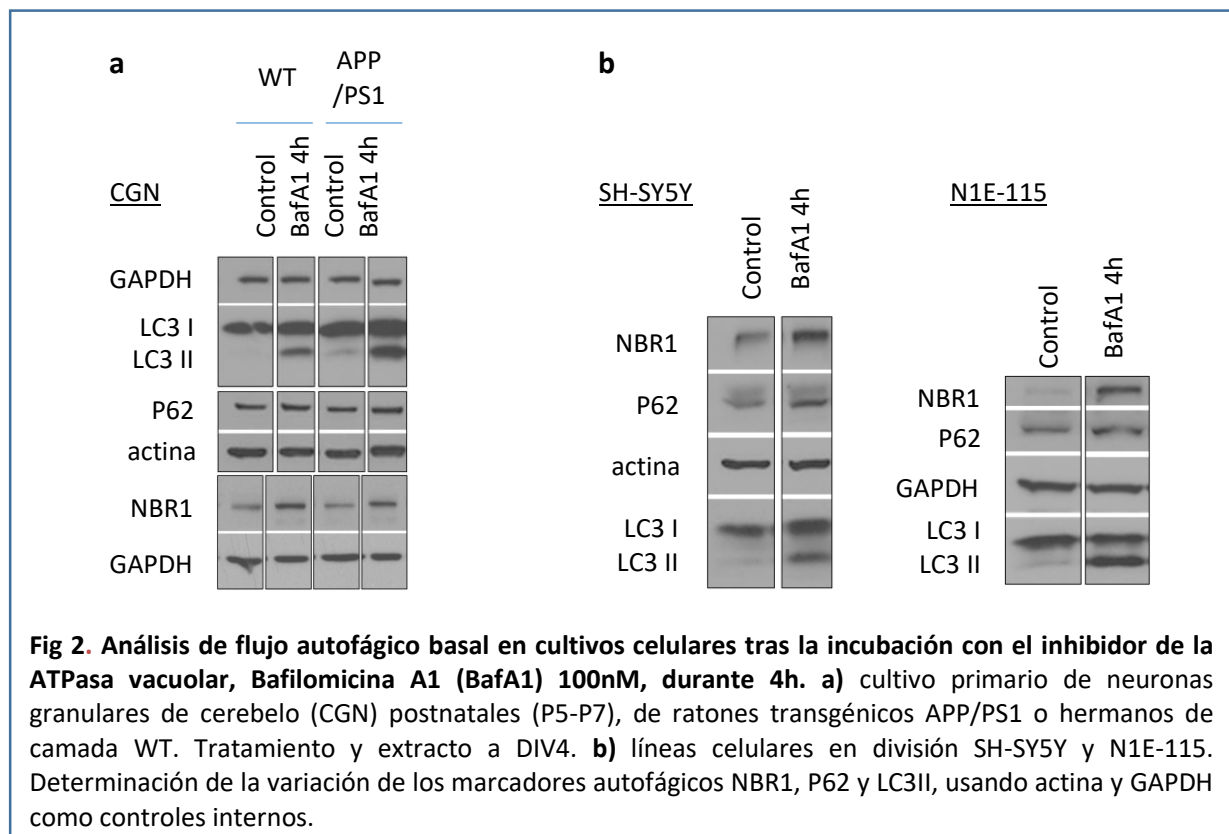
de marcadores autofágicos en la patología. Para discernir el papel de la autofagia en neuronas, y su implicación en Alzheimer, realizamos cultivos primarios de neuronas procedentes de nuestro modelo murino APP/PS1, y de los hermanos de camada WT con igual fondo genético. Como indicamos en materiales y métodos, trabajamos con neuronas granulares de cerebelo (CGN, *cerebellar granule neurons*) que nos permite realizar un genotipado y selección de las crías previo al cultivo a P5-P7.



De esta manera, se hicieron estudios en paralelo entre cultivos de CGN APP/PS1 y WT para su análisis comparativo. A DIV4 se obtuvieron los extractos solubles de CGN y se analizaron los niveles de NBR1, P62/SQSTM1 y LC3II (Fig 2a). Observamos que los niveles de LC3II tendían a ser mayores en cultivos de neuronas APP/PS1 que WT, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de NBR1 y P62. Al bloquear la degradación lisosomal con el inhibidor de la v-ATPasa Bafilomicina A1 (BafA1) durante 4h, se observó un incremento de todos los marcadores autofágicos, siendo especialmente visible en el caso de NBR1 y LC3II (Fig 2a). Esta medida nos permitió constatar la existencia de un flujo autofágico eficaz en neuronas de ambos genotipos. Además, el aumento de los marcadores con BafA1 respecto a la condición basal era proporcional, sin apreciar diferencias significativas entre ambos genotipos, por

lo que no pudimos atribuir el posible aumento de LC3II en APP/PS1 ni a una mayor inducción de autofagia ni a un bloqueo de la degradación por el lisosoma. Por otro lado, no se obtuvieron diferencias en los niveles de activación de la ruta mTORC1 entre WT y APP/PS1 al mirar los niveles de p-P70S6K(T389) o de p-S6(S240/244) en cultivo (Datos no mostrados).

Para profundizar en el estudio de la autofagia en neuronas y comprobar si su comportamiento era común al linaje neuronal, nos apoyamos en el uso de líneas celulares procedentes de neuroblastoma, como la humana SH-SY5Y o la murina N1E-115. Análogamente, al realizar un experimento de flujo autofágico tratando 4h con BafA1, pudimos observar la acumulación de los marcadores autofágicos NBR1, P62 y LC3II de manera eficiente en ambos linajes (Fig 2b).



1.3. Conclusiones

- Los marcadores de autofagia se encuentran alterados en la patología de Alzheimer tanto en tejido cerebral *post mortem* de pacientes como de ratones APP/PS1.
- La vía mTORC1 parece estar alterada tanto en cerebros de pacientes de Alzheimer como del ratón modelo APP/PS1, aunque no hemos podido detectar diferencias a nivel neuronal entre ratones APP/PS1 y WT.
- Existe una autofagia basal eficiente tanto en cultivo de neuronas WT como transgénicas APP/PS1, así como en las líneas celulares de origen neuronal testadas (SH-SY5Y, N1E115).

2. La Rapamicina reduce la amiloidosis en el ratón transgénico APP/PS1 por inducción de autofagia mTORC1 dependiente.

Observaciones previas de que la vía mTORC1 podría estar alterada en cerebros de Alzheimer, al igual que vimos en nuestras muestras, permite retomar la idea de que la modulación de la misma, y por consiguiente de la autofagia, podría tener repercusión en los acúmulos de amiloide.

De acuerdo a la controversia de los últimos años sobre el papel de la autofagia en la amiloidosis, nos preguntamos si su alteración participa en el desarrollo de la patología o si en cambio surge como respuesta celular protectora ante el daño. Así, la inducción de autofagia podría proveer a la célula de vesículas ácidas donde favorecer el procesamiento amiloidogénico de la proteína APP o, por el contrario, podría tener un efecto terapéutico al promover la degradación de los acúmulos de beta-amiloide.

Basándonos en datos previos, elegimos la Rapamicina para analizar el efecto de la inhibición de mTORC1, y consiguiente inducción de autofagia, tanto en modelos *in vivo* (ratones APP/PS1 y WT) como *ex vivo* (cultivos neuronales). Como control de que la Rapamicina inhibe eficazmente mTORC1, se midieron los niveles de fosforilación de su diana P70-S6Kinasa en Thr389, así como del sustrato de esta quinasa S6 en Ser240/244.

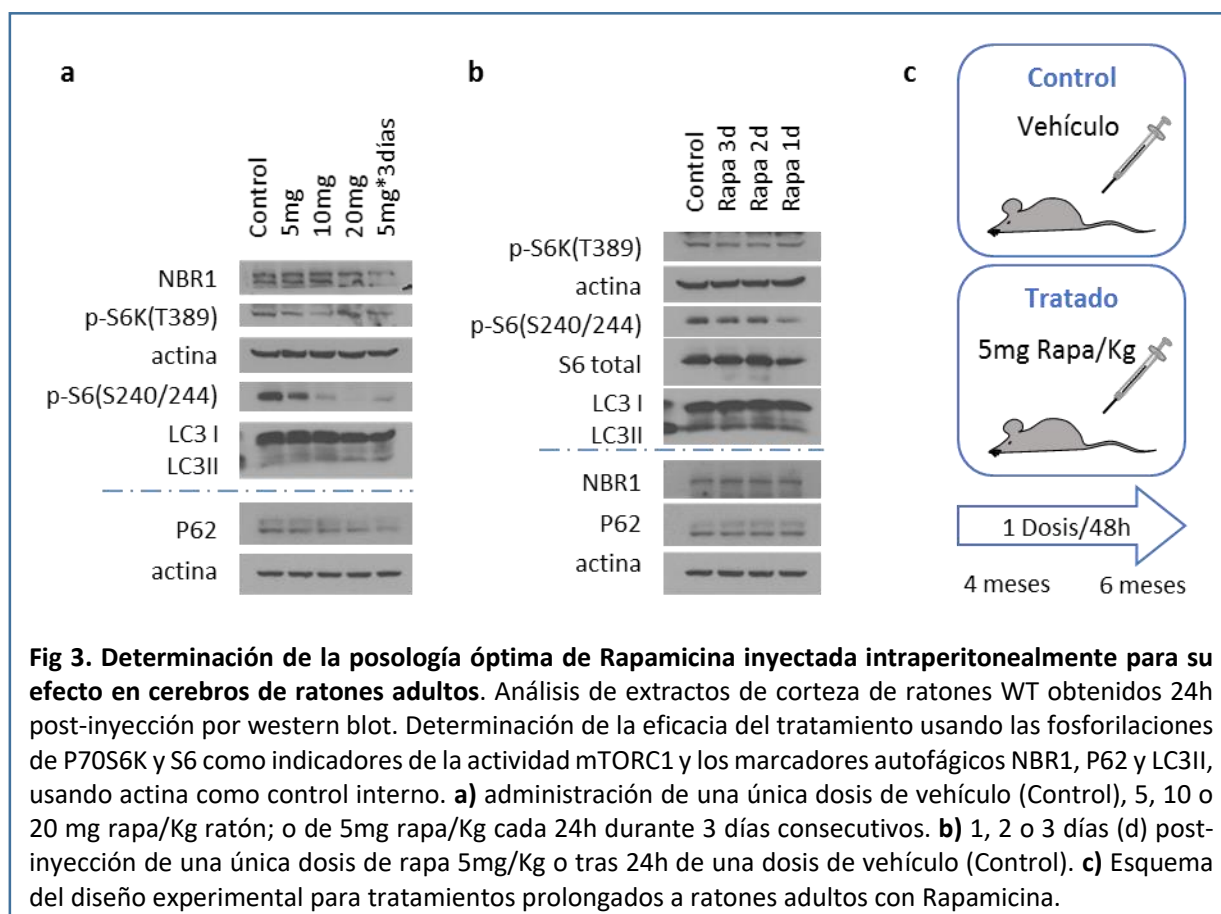
2.1. La Rapamicina administrada intraperitonealmente tiene efecto en cerebro.

Quisimos comprobar si la Rapamicina podría atravesar la barrera hematoencefálica y tener un efecto fisiológico en cerebro de ratones adultos, con el fin último de usarla para tratamientos prolongados en ratones APP/PS1. Así, realizamos una serie de experimentos preliminares en ratones WT adultos para determinar la posología óptima.

Basándonos en la literatura, elegimos la administración intraperitoneal de la Rapamicina tal y como se describe en materiales y métodos. En un primer experimento piloto, testamos las concentraciones de 5, 10 y 20mg Rapamicina por Kg de masa corporal a tres ratones diferentes, y los sacrificamos a las 24h post-inyección para el análisis de extractos cerebrales por western blot (Fig 3a). La disminución en los niveles de fosforilación tanto de P70S6K como de S6 en cerebro indicaron una reducción en la actividad de mTORC1, lo que nos confirmó que la Rapamicina era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar en cerebro. Se observaron sutiles variaciones en los marcadores autofágicos LC3II, P62 o NBR1, pero no fueron significativas. Si bien los efectos en cerebro sobre mTORC1 más evidentes se observaron a concentraciones de 10 y 20mg/Kg, comprobamos que dosis más bajas de 5mg repetidas cada 24h durante 3 días presentaban un efecto acumulativo en el tiempo (Fig 3a).

En un segundo experimento piloto, analizamos el tiempo de recuperación del sistema mTORC1 tras una inyección única de 5mg/Kg sacrificando a 24h, 48h o 72h (Fig 3b). Los niveles de p-S6(240/244) indicaban una recuperación parcial a partir del segundo día post-inyección. No observamos diferencias en los marcadores autofágicos. Así, consideramos que un intervalo de 48h entre dosis sería suficiente para mantener bajo el nivel de actividad de la vía mTORC1.

Determinamos así que la posología óptima para tratamientos prolongados de Rapamicina sería de una inyección cada 48h de 5mg/Kg de concentración (Fig 3c).



2.2. La Rapamicina reduce los niveles de beta-amiloide en el ratón APP/PS1.

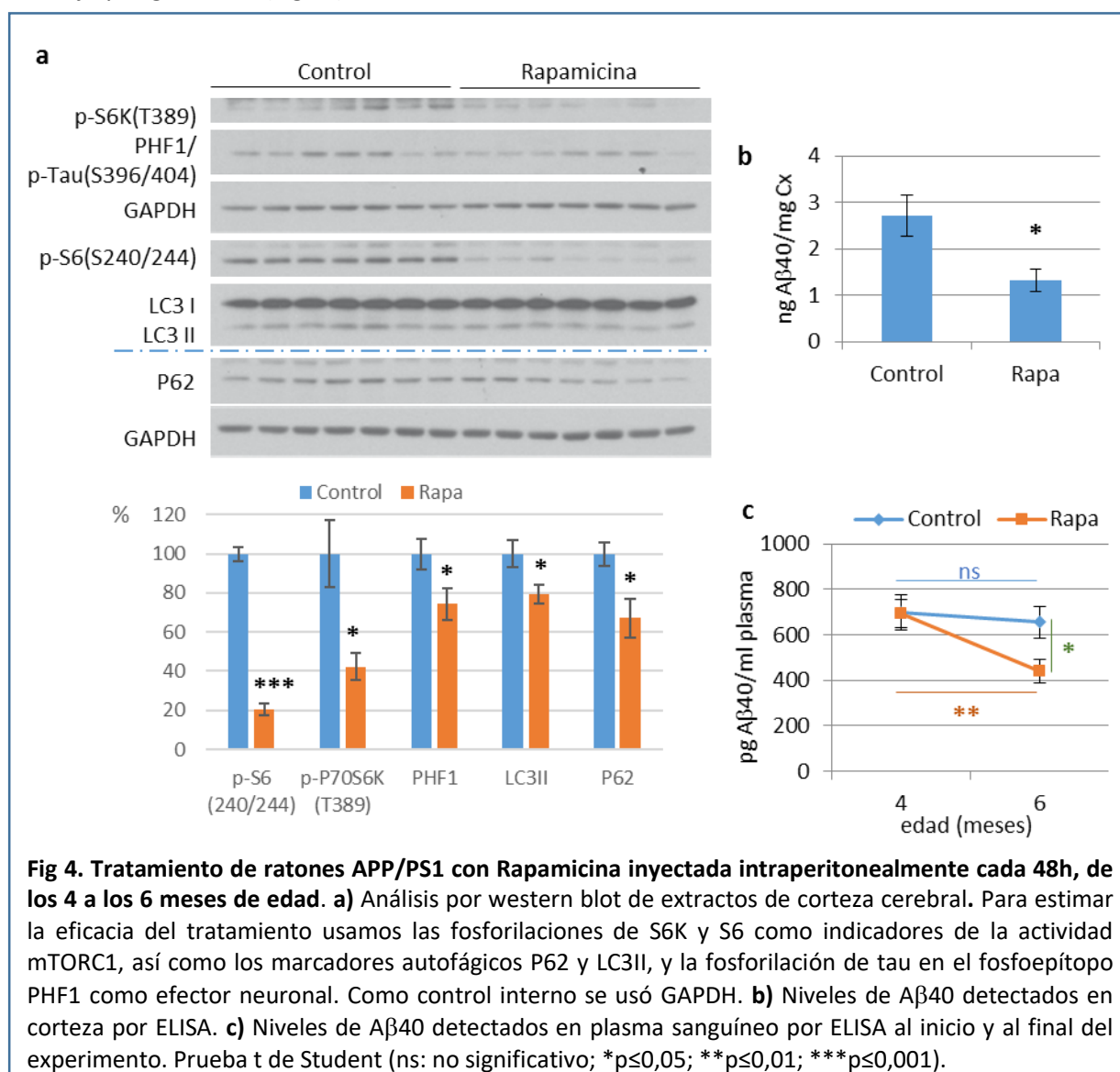
Quisimos comprobar si la Rapamicina podría tener un efecto terapéutico en nuestro modelo de la enfermedad de Alzheimer, o si por el contrario agravar su patología. Para ello, administramos Rapamicina a ratones adultos de nuestro modelo APP/PS1, así como *ex vivo* a cultivos de neuronas para determinar si se trataba de un efecto autónomo neuronal, y medimos los niveles de beta-amiloide humano 1-40 (A β 40).

2.2.1. Efecto fisiológico de la Rapamicina en ratones APP/PS1.

El tratamiento de Rapamicina se realizó conforme a la prueba previa *in vivo*, con una posología de 5mg/Kg cada 48h, en ratones transgénicos APP/PS1 (Fig 3c). El grupo control recibió el solvente con igual periodicidad. Todos los ratones fueron del mismo sexo para reducir la variabilidad, en este caso machos. Debido a la alta variabilidad inter-individuo en los niveles de beta-amiloide en este linaje, empleamos una n=9 para cada grupo y una duración total de dos meses para poder apreciar diferencias significativas. El experimento se realizó entre las edades de 4 y 6 meses, periodo en el que los ratones APP/PS1 sufren un incremento exponencial de beta-amiloide que empieza a formar depósitos en cerebro, según datos previos del laboratorio (Ordóñez-Gutiérrez et al., 2015). Se tomaron muestras de sangre a tiempo cero y al finalizar el experimento. Tras los dos meses de tratamiento, los ratones

fueron sacrificados y se obtuvieron diferentes partes del cerebro para analizar marcadores proteicos por western blot y A β 40 mediante ELISA.

A partir de corteza cerebral, mediante western blot, determinamos la actividad mTORC1 (según p-P70S6K(T389) y p-S6(S240/244)), los marcadores autofágicos (P62, LC3II) y el efecto en neuronas (usando el anticuerpo anti-tau fosforilado PHF1; (Avila et al., 2004)) (Fig 4a). Así, la menor fosforilación de P70S6K y de S6 indicaron que la Rapamicina era capaz de seguir inhibiendo mTORC1 en cerebro tras dos meses de tratamiento. Dicho tratamiento ejerció un claro efecto en neuronas ya que la proteína tau presentó menores niveles de fosforilación en el fosfo-epítipo PHF1. Si bien los niveles de LC3II se vieron disminuidos, la reducción conjunta de P62 sugiere una mejora en la eficiencia del flujo y degradación (Fig 4a).



Para determinar si la mayor degradación por autofagia tenía repercusión en los niveles de amiloidosis, cuantificamos la acumulación de A β 40 por ELISA. Comprobamos que los niveles de péptido amiloide presentes en corteza cerebral era inferiores en los ratones tratados con Rapamicina en comparación con los controles (Fig 4b). Además, medimos los niveles de A β 40 en sangre antes del experimento y al finalizar el mismo, y pudimos comprobar una significativa bajada de más del 30% de

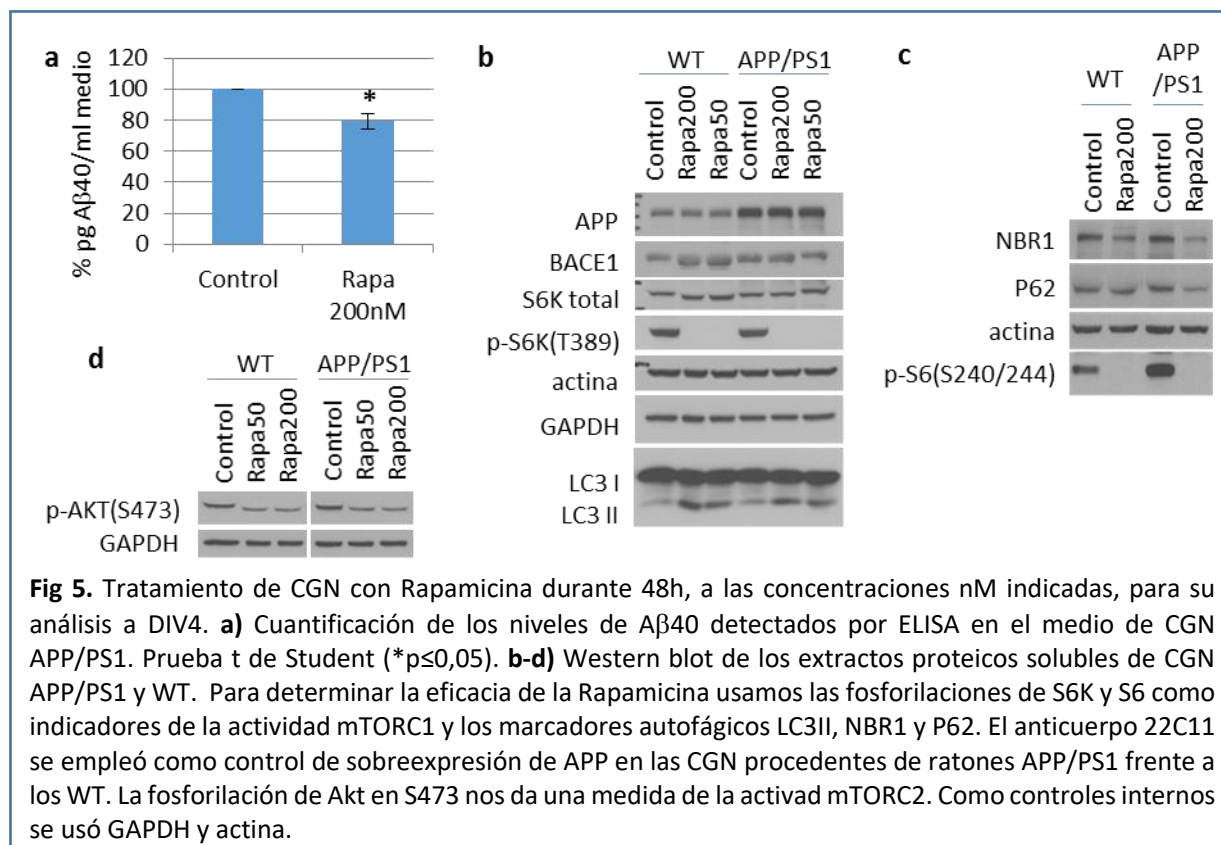
media tras el tratamiento con Rapamicina (Fig 4c). Los niveles de A β 40 en sangre del grupo control no mostraron cambios significativos tras los dos meses de inyección del vehículo.

Estos resultados permiten postular que la Rapamicina presenta un efecto terapéutico en nuestro modelo murino de Alzheimer, al reducir los niveles de beta-amiloide así como la hiperfosforilación de tau. La mayor eficiencia degradativa derivada de los menores niveles de P62 y LC3II, sugiere que el mecanismo de acción podría ser la eliminación del péptido A β por inducción de autofagia.

2.2.2. La Rapamicina disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGN APP/PS1.

Debido al posible interés terapéutico asociado, quisimos verificar si la reducción de beta-amiloide por Rapamicina está mediada por una inducción de autofagia dependiente de mTORC1. Como ya mencionamos, los datos obtenidos a partir de homogeneizados de tejido cerebral reflejan el resultado de la interacción de diversas comunidades celulares. Quisimos discernir si el efecto de la Rapamicina en la amiloidosis de nuestro modelo se producía específicamente a nivel neuronal.

Se realizó un cultivo primario de CGN APP/PS1 y, a diferentes tiempos, se sustituyó el medio por medio fresco con varias concentraciones de Rapamicina para su análisis a DIV4. De estos cultivos se recogieron los sobrenadantes para determinar los niveles de A β 40 secretados al medio extracelular mediante ELISA específico. A las 48h de tratamiento con Rapamicina se pudo observar una disminución de los niveles de A β 40 con la concentración siendo significativa a 200nM (Fig 5a).



Para comprobar la efectividad de la Rapamicina, se realizaron experimentos en paralelo en CGN WT y APP/PS1 para su análisis por western blot. Atendiendo a los niveles de fosforilación de P70S6K y S6, se comprobó que la Rapamicina seguía generando una inhibición de la vía mTORC1 tras 48h de tratamiento (Fig 5b, c). Además, se observó un aumento de los niveles de LC3II así como una disminución de NBR1 y P62, lo que reflejaba un aumento de la tasa de degradación por autofagia (Fig 5b, c). Puesto que los niveles totales de las proteínas amiloidogénicas APP y BACE1 no se vieron reducidos (Fig 5b), el efecto de la Rapamicina sobre los niveles de A β 40 se debería presumiblemente a su degradación por aumento de la autofagia. No obstante, el tratamiento prolongado de 48h generó una disminución de la fosforilación de Akt en S473, lo que era indicativo de la afectación al complejo mTORC2 descrita para Rapamicina a largo plazo (Fig 5d).

2.3. La Rapamicina aumenta discretamente el flujo autofágico en sistemas neuronales.

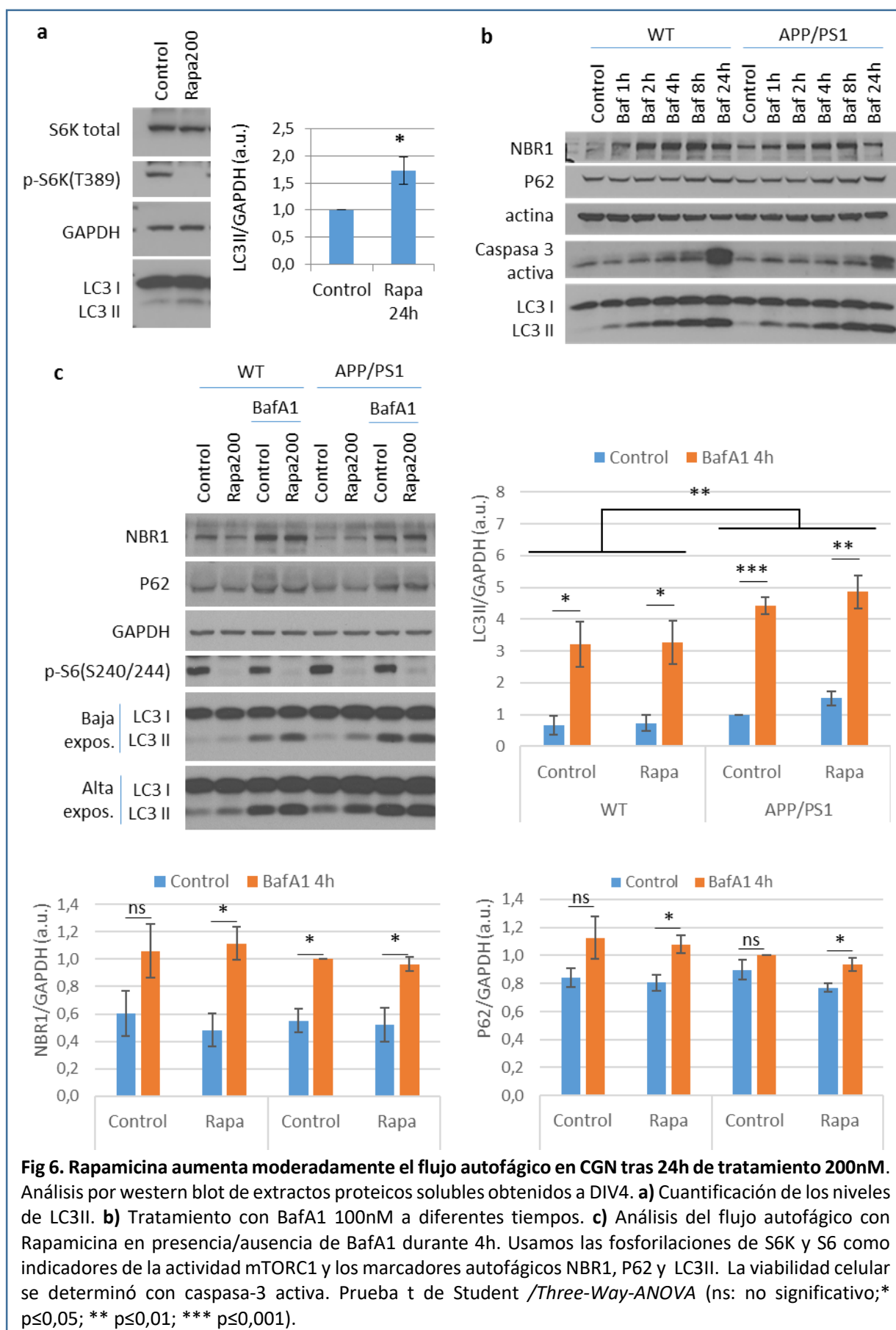
De los datos anteriores se podría concluir que la disminución del péptido beta-amiloide por Rapamicina se debería a un incremento en la autofagia. Sin embargo, como mencionamos en la introducción, la regulación de la autofagia en neuronas podría diferir de la observada en otros tipos celulares por su estado post-mitótico y altamente polarizado. Además, a tratamientos prolongados de 48h, la Rapamicina acabó afectando al complejo mTORC2. Por ello, procedimos a estudiar en detenimiento la modulación de autofagia por Rapamicina en sistemas neuronales.

2.3.1. Rapamicina aumenta ligeramente el flujo autofágico y la consecuente degradación de adaptadores autofágicos por el lisosoma.

En primer lugar, quisimos comprobar que la Rapamicina estaba induciendo autofagia en nuestros sistemas neuronales. Para reducir la afectación de mTORC2, disminuimos el tiempo de tratamiento a 24h. Comprobamos que a 24h la Rapamicina reducía la actividad de la vía mTORC1, al disminuir p-P70S6K(T389), y que generaba un aumento de LC3II estadísticamente significativo (Fig 6a). Para descartar que el aumento de LC3II con Rapamicina se debiese a un bloqueo del sistema, procedimos a estudiar el flujo autofágico con Bafilomicina.

De manera preliminar, realizamos una curva de tiempo con BafA1 100nM tanto en neuronas WT como APP/PS1, donde pudimos apreciar la acumulación progresiva de los marcadores autofágicos LC3II, NBR1 y en menor medida P62, acorde a la interrupción de su degradación (Fig 6b). Atendiendo a los niveles de caspasa-3 activa, tiempos prolongados de 24h generaron una alta toxicidad en el sistema. Esto nos hizo descartar la administración de Bafilomicina de manera simultánea al tratamiento de 24h con Rapamicina. Consideramos un tiempo de análisis de flujo de 4h como suficiente para apreciar una acumulación de marcadores autofágicos significativa sin comprometer la viabilidad neuronal.

Así, cultivamos CGN de genotipo WT o APP/PS1 y, tras 24h de tratamiento con Rapamicina, añadimos BafA1 en las últimas 4h para su análisis por western blot (Fig 6c). Como marcador de la efectividad de Rapamicina sobre la vía mTORC1 observamos una drástica reducción en p-S6(S240/244).



Como medida del flujo autofágico, comparamos los niveles de LC3II en presencia de Bafilomicina frente a las condiciones basales, tanto en autofagia constitutiva (Control) como inducida (Rapamicina). Se pudo apreciar una tendencia a aumentar el flujo autofágico con Rapamicina tanto en neuronas WT como transgénicas, aunque no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, observamos que la acumulación de los adaptadores autofágicos P62 y NBR1 en presencia de Bafilomicina, respecto a la condición basal, era mayor con el tratamiento de Rapamicina (Fig 6c).

Con todo, deducimos que el tratamiento prolongado de 24h con Rapamicina genera un incremento de LC3II como resultado de un discreto aumento en el flujo autofágico, y la consiguiente mayor tasa de degradación, tanto en CGN WT como APP/PS1 (Fig 6c).

2.3.2. La mayor tasa de degradación por Rapamicina está mediada por autofagia dependiente de ATG5.

Para comprobar que la mayor tasa de degradación producida por Rapamicina en neuronas estaba mediada por autofagia, decidimos interferir un miembro de la familia de las ATGs, la proteína ATG5. Como comentamos en la introducción, estas proteínas intervienen en la formación del autofagosoma, por lo que su interferencia prevendría el inicio del proceso. Para ello, empleamos el linaje neuronal SH-SY5Y, cuya transfección es más eficiente que en CGN.

Como indicamos en materiales y métodos, realizamos una transfección transitoria con dos interferentes de Atg5, sh963 y sh40, además de un shRNA con una secuencia irrelevante como control (shCo), empaquetados en lentivirus. Entre las 48h y las 72h post-infección, cuando la interferencia de la expresión de ATG5 es máxima, se hizo un tratamiento con Rapamicina 200nM de 24h. 4h antes de detener el experimento añadimos BafA1 100nM, o DMSO como control, para analizar el flujo autofágico (Fig 7).

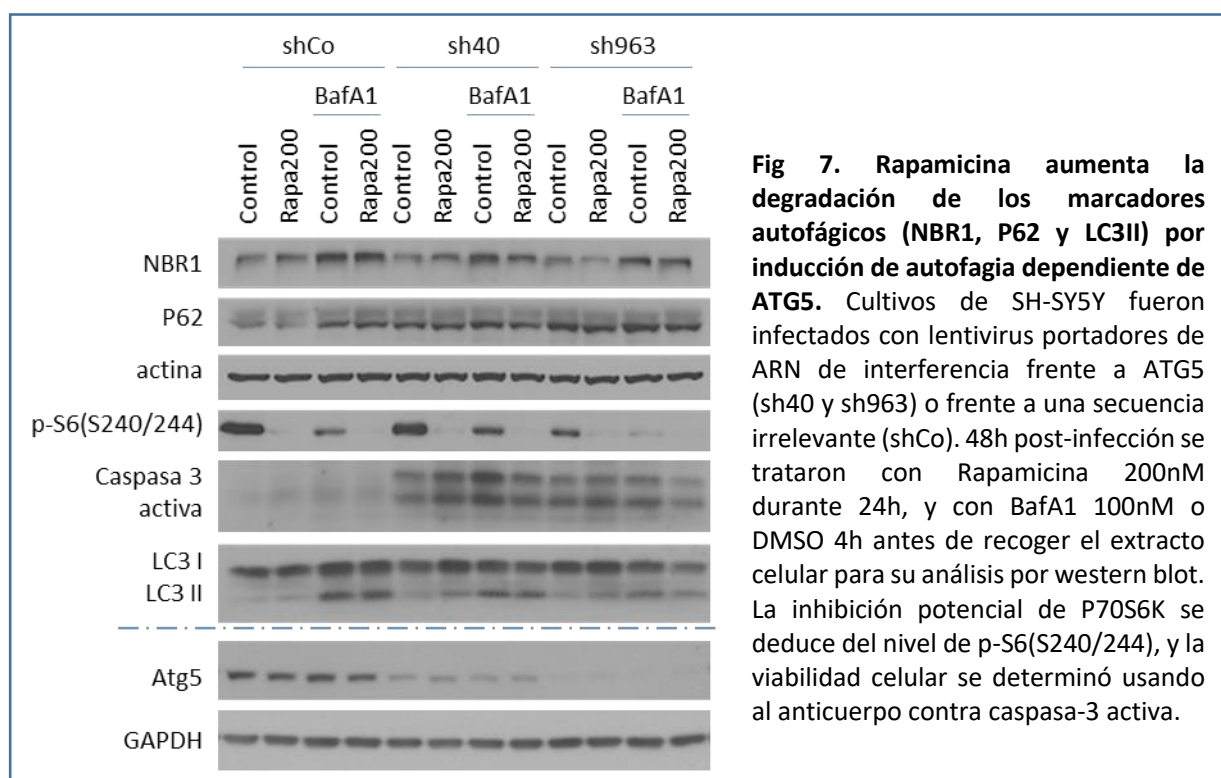


Fig 7. Rapamicina aumenta la degradación de los marcadores autofágicos (NBR1, P62 y LC3II) por inducción de autofagia dependiente de ATG5. Cultivos de SH-SY5Y fueron infectados con lentivirus portadores de ARN de interferencia frente a ATG5 (sh40 y sh963) o frente a una secuencia irrelevante (shCo). 48h post-infección se trataron con Rapamicina 200nM durante 24h, y con BafA1 100nM o DMSO 4h antes de recoger el extracto celular para su análisis por western blot. La inhibición potencial de P70S6K se deduce del nivel de p-S6(S240/244), y la viabilidad celular se determinó usando al anticuerpo contra caspasa-3 activa.

Los datos indican una importante reducción de la expresión de ATG5 por sh963, siendo algo más moderada en el caso de sh40 (Fig 7). Como bien refleja el aumento de la activación de caspasa3, no pudimos prolongar los tiempos de análisis con selección por puromicina por la gran mortalidad que generaba la interferencia de ATG5.

Proporcionalmente a la reducción de ATG5 por cada interferente, disminuyó la formación de AVs, tal y como se puede apreciar al bloquear el aclaramiento de LC3II por el lisosoma con Bafilomicina. Acorde a esto, la interferencia de ATG5 impidió la degradación de P62 tanto por autofagia basal (control) como inducida (Rapamicina), alcanzando niveles tan altos como los observados al bloquear su eliminación con BafA1. Si bien el efecto no fue tan drástico en NBR1, también se pudo apreciar una ligera disminución en su tasa de degradación (Fig 7). Verificamos así que la degradación inducida por Rapamicina de los marcadores P62, LC3II y en menor medida NBR1, está mediada por el discreto aumento de flujo autofágico observado.

2.4. El discreto aumento del flujo autofágico por Rapamicina es connatural al sistema neuronal.

En la bibliografía está descrito que la Rapamicina induce autofagia de manera drástica en líneas celulares. Por tanto, quisimos comprobar si el moderado aumento del flujo observado en CGN estaba asociado a la Rapamicina *per se*, a un efecto de BafA1 en neuronas, a la inducción de autofagia mTORC1 dependiente, o si por el contrario era característica del sistema neuronal.

2.4.1. El efecto de la Rapamicina en CGN observado con BafA1 es reproducido con otros bloqueantes de flujo.

Para descartar que se tratase de un efecto secundario de BafA1 en neuronas, analizamos diferentes inhibidores de la degradación mediada por lisosoma como la Cloroquina (CQ) o el cloruro de amonio (NH₄Cl) (Fig 8a). Si bien tanto la CQ como el NH₄Cl generaron una acumulación más acusada de LC3II que BafA1, tampoco se apreciaron diferencias claras en el flujo autofágico con el tratamiento Rapamicina respecto al control. Como control negativo, empleamos la inhibición específica del proteosoma con MG132, y comprobamos que no había ningún efecto adicional a la Rapamicina en los niveles de LC3II (Fig 8a).

2.4.2. El efecto de la Rapamicina en CGN es reproducido por un inductor de autofagia independiente de mTOR.

Para comprobar si el moderado efecto de la Rapamicina sobre el flujo autofágico era exclusivo de la inducción dependiente de mTORC1, analizamos un inductor de autofagia independiente de esta ruta previamente descrito, la Calpeptina. Realizamos un experimento de flujo con BafA1, comparando el efecto de Rapamicina y Calpeptina en paralelo (Fig 8b). Comprobamos que efectivamente, a diferencia de Rapamicina, la Calpeptina no disminuyó la fosforilación de S6K en T389. Si bien, ambos compuestos tuvieron un efecto moderado similar en el flujo autofágico respecto al control, según los niveles de acumulación de LC3II con BafA1. Por ello, consideramos que el ligero aumento de flujo observado en neuronas con Rapamicina no era una particularidad del mecanismo de inducción dependiente de mTORC1, ya que un efecto similar se obtuvo con un inductor de autofagia independiente de esta ruta.

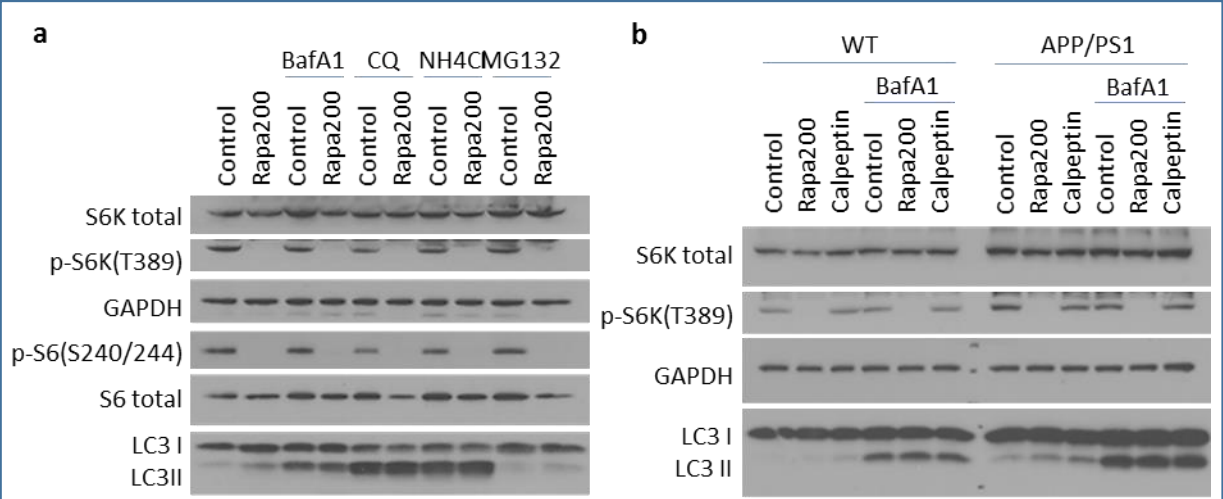


Fig 8. Análisis comparativo de la inducción de autofagia mediada por diferentes compuestos. Western blot de extractos proteicos solubles de CGN obtenidos a DIV4. Analizamos autofagia con el marcador LC3II y la actividad mTORC1 con las fosforilaciones de S6K y S6. **a)** Las neuronas fueron tratadas durante 24h con Rapamicina 200nM, y con BafA1 100nM, CQ 50uM, NH4Cl 15mM o MG132 10uM en las últimas 4h. **b)** CGN WT o APP/PS1 tratadas durante 24h con Rapamicina 200nM o Calpeptina 5uM, y con BafA1 100nM en las últimas 4h. Se puede observar que la ligera inducción de autofagia con Rapamicina en CGN es independiente del sistema de bloqueo de la degradación lisosomal y análoga a la producida por Calpeptina.

2.4.3. La línea neuronal SH-SY5Y, pero no N1E-115, mimetiza la respuesta autofágica de CGN.

Quisimos comprobar si la Rapamicina generaba una respuesta similar a la observada en CGN en cultivos celulares de los linajes neuronales de origen humano SH-SY5Y y murino N1E-115. Realizamos un experimento análogo de flujo autofágico administrando BafA1 en las últimas 4h del tratamiento de 24h con Rapamicina. Comprobamos la eficiencia de la Rapamicina sobre la actividad de la vía mTORC1 mediante los fosfo-epítopos p-P70S6K(T389) o p-S6(240/244), y sobre el flujo autofágico con los marcadores LC3II, NBR1 y P62 (Fig 9a, b). Observamos una importante inducción del flujo autofágico por Rapamicina en N1E-115, con una mayor acumulación de todos los marcadores autofágicos respecto al control al bloquear la acidificación lisosomal con BafA1 (Fig 9b). No obstante, este efecto de la Rapamicina fue mucho más moderado en SH-SY5Y (Fig 9a), recordando a los resultados obtenidos previamente en CGN (Fig 6c).

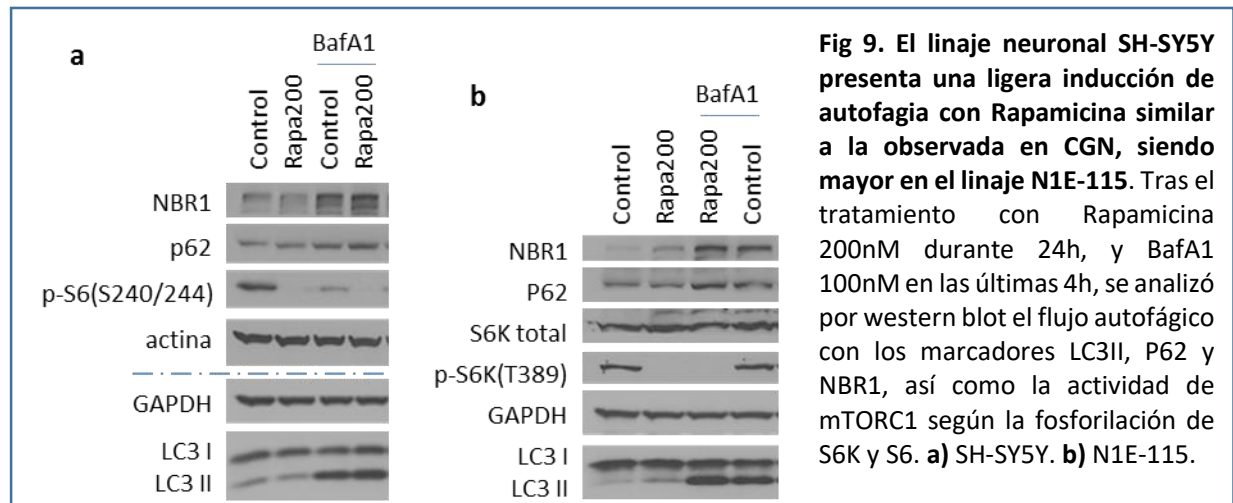


Fig 9. El linaje neuronal SH-SY5Y presenta una ligera inducción de autofagia con Rapamicina similar a la observada en CGN, siendo mayor en el linaje N1E-115. Tras el tratamiento con Rapamicina 200nM durante 24h, y BafA1 100nM en las últimas 4h, se analizó por western blot el flujo autofágico con los marcadores LC3II, P62 y NBR1, así como la actividad de mTORC1 según la fosforilación de S6K y S6. **a)** SH-SY5Y. **b)** N1E-115.

Puesto que el cultivo de SH-SY5Y mostró una respuesta autofágica a Rapamicina similar a la observada en CGN, elegimos este linaje celular como modelo neuronal para futuros estudios de autofagia en neuronas. En cambio, comprobamos que otros linajes celulares podrían responder de manera más drástica a estímulos autofágicos, como la N1E-115, probablemente asociado al diferente metabolismo de células con altas tasas de división y fenotipo más tumoral.

2.4.4. Análisis de la modulación de autofagia en neuronas en respuesta a la inhibición de mTORC1 por un déficit de aminoácidos.

El efecto moderado en el flujo autofágico observado con la Rapamicina podría ser característico de la inducción de autofagia dependiente de mTORC1 en CGN o, por el contrario, particular del compuesto químico *per se*. Por ello, quisimos analizar más a fondo el mecanismo de inducción de autofagia dependiente de mTORC1 en neuronas, mediante otras estrategias descritas en la bibliografía como la deficiencia de aminoácidos y/o factores tróficos (Roczniak-Ferguson et al., 2012; Carroll et al., 2015; Klionsky et al., 2016). La privación de nutrientes constituye un mecanismo más fisiológico de inhibición de mTORC1 y activación de autofagia. Se ha descrito que la falta de aminoácidos esenciales, como leucina o glutamina, genera inducción de autofagia mTOR dependiente en cultivos celulares. Por ello, cultivamos nuestras células neurales en ausencia de alguno de ellos y analizamos los niveles de autofagia y actividad de mTORC1.

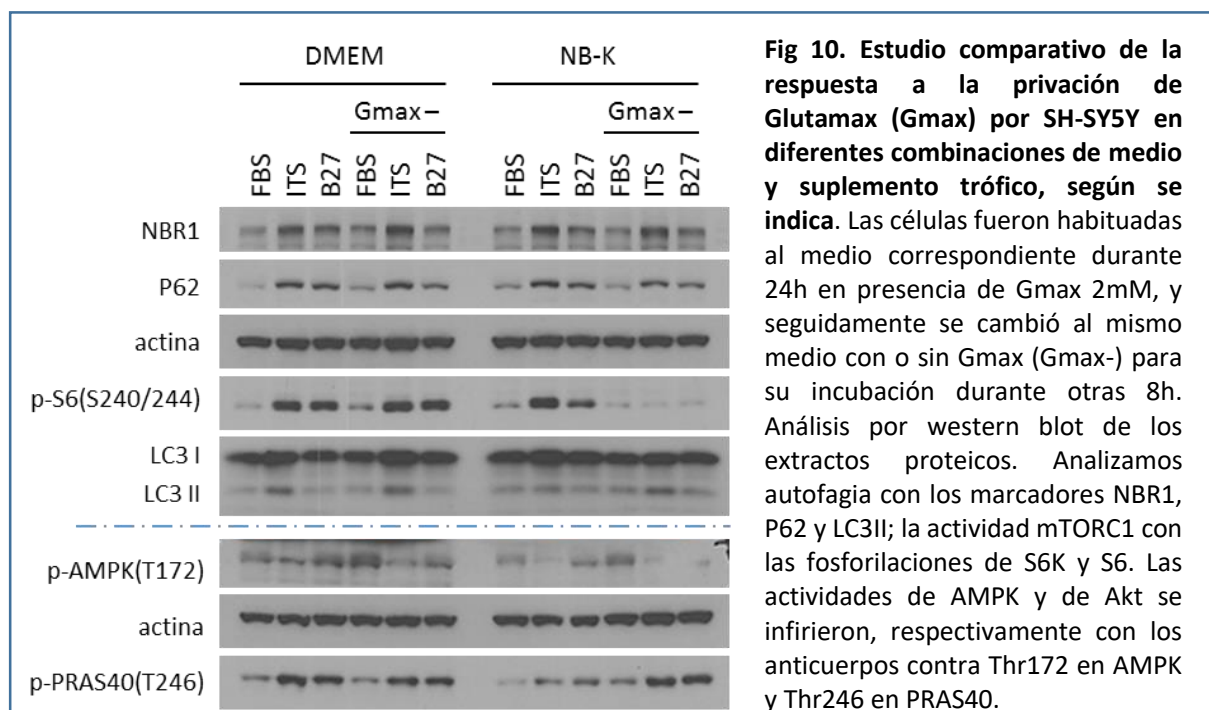
De rutina, cultivamos las células SH-SY5Y en DMEM completo con 10%FBS, lo que supone un aporte de nutrientes complejo y de composición exacta desconocida. Para poder hacer los experimentos con una falta de aminoácidos controlada, tuvimos que adaptar el sistema. Para ello, testamos la respuesta celular a la falta de glutamina en diferentes condiciones, comparando el medio DMEM con el medio comercial Neurobasal (NB-K) y los suplementos de factores tróficos FBS, B27 e ITS (Fig 10). Puesto que la glutamina (Gln) se descompone en glutámico, para controlar la concentración en el medio empleamos su análogo comercial más estable Glutamax (Gmax). En todos los casos habituamos durante 24h a las células en medio NB o DMEM con la concentración usual de Gmax (2mM). Entonces cambiamos el medio al correspondiente con o sin Gmax durante 8h más.

En primer lugar, empleamos la fosforilación de S6 en S240/244 como indicador de la actividad mTORC1, pudiendo resaltar varios hechos:

- Tanto en DMEM como en NB-K, el crecimiento de las células con FBS mantuvo la actividad de la vía mTORC1 a niveles bajos, en comparación con otros suplementos tróficos. Esto impidió la apreciación de una modulación de la vía al privar las células de Gmax, por lo que descartamos el uso de FBS como suplemento (Fig 10).
- Centrando la atención en las células crecidas en DMEM, observamos que la eliminación de Gmax no provocó ningún cambio aparente en p-S6(S240/244), independientemente del suplemento trófico empleado. Por tanto, descartamos el uso de DMEM para este estudio (Fig 10).
- La privación de Gmax en NB-K, tanto con ITS como con B27, sí que disminuyó la fosforilación de S6 en S240/244, de lo que se infiere una menor actividad de la vía mTORC1/P70S6K. Curiosamente, pudimos apreciar un aumento en la fosforilación inhibitoria de PRAS40 en T246, que favorecería la actividad de mTORC1. Esta fosforilación es diana de Akt, lo que nos

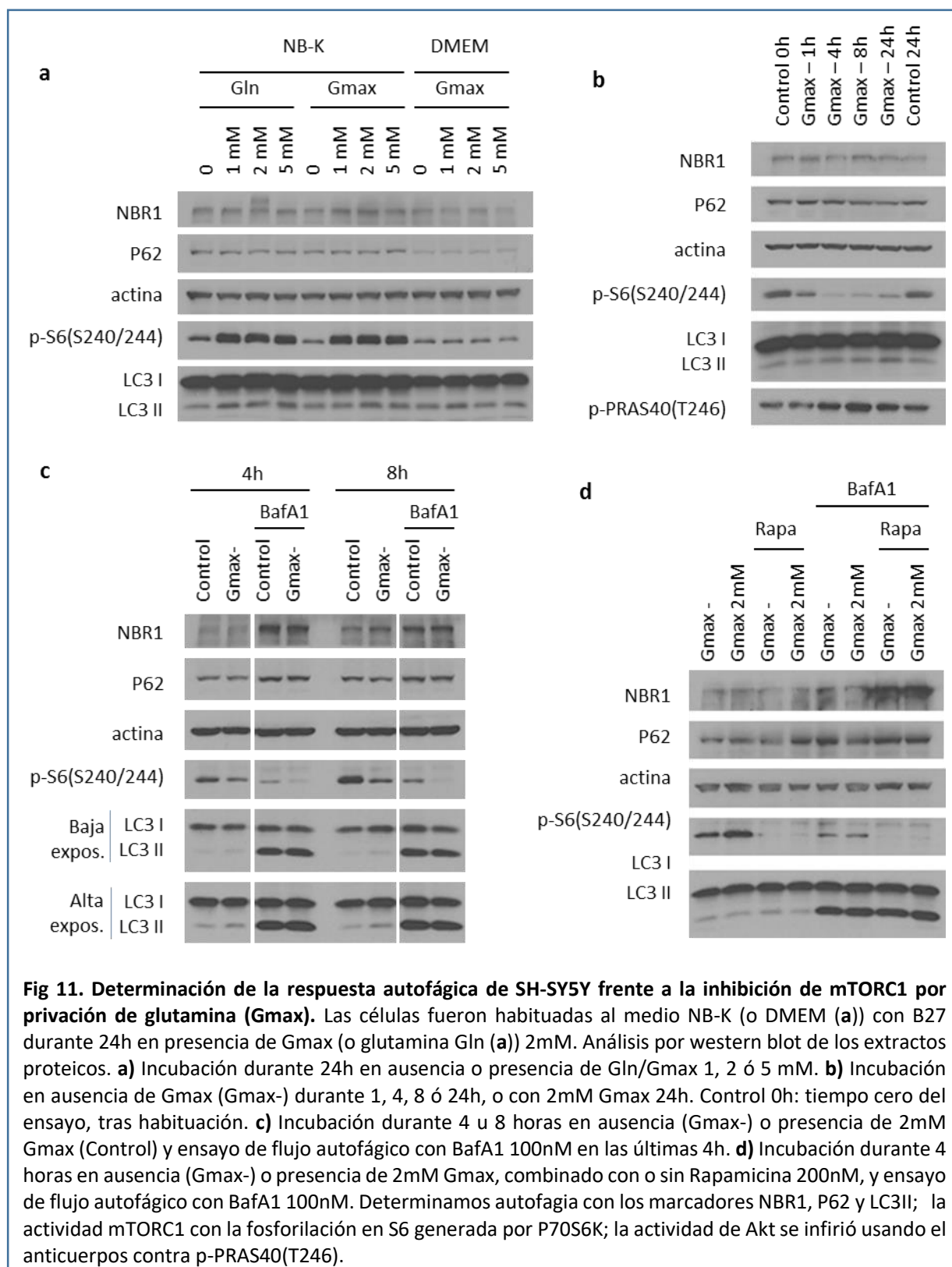
sugiere un nivel de activación alto de la vía PI3KC1/Akt (Fig 10). No obstante, aunque la vía PIK3C1/Akt esté activa hasta este nivel, creemos este dato no estaría contraposición con una inhibición de mTORC1 por falta de aminoácidos a nivel de v-ATPasa-Ragulator-RAGs en la membrana lisosomal (Jewell J Guan 2013).

En segundo lugar, analizamos los marcadores autofágicos y comparamos sus niveles en las condiciones de crecimiento NB-K suplementado con ITS o B27. No observamos diferencias significativas en ningún caso en presencia o ausencia de Gmax. Sin embargo, los niveles de NBR1, P62 y LC3II tendían a ser mayores en ITS en comparación con B27. Esto, junto con la menor actividad de AMPK según su fosforilación T172, podría ser indicativo de una menor eficiencia de degradación por autofagia. Por tanto, entre los dos suplementos, elegimos el B27 para descartar la implicación de la alteración de otras rutas de señalización en la inhibición de mTORC1 (Fig 10).



Para descartar que el efecto observado en NB-K sea debido a algún efecto adicional del compuesto Gmax, hicimos un experimento control usando el mismo medio suplementado con Glutamina (Gln) o Gmax a diferentes concentraciones (Fig 11a). A diferencia de la comparación entre medios NB-k y DMEM, las desigualdades entre Gln y Gmax eran prácticamente indetectables, como por ejemplo en la fosforilación p-S6(S240/244) o en los niveles de P62 y NBR1. Tampoco apreciamos diferencias entre concentraciones de Gln/Gmax, lo que sugiere que ninguna es limitante para un tiempo de 24h (Fig 11a).

Establecidas las condiciones de NB-K y B27 en los estudios de privación de aminoácidos para inhibir mTORC1, sometimos a las SH-SY5Y a diferentes tiempos sin Gmax para analizar más en detalle la señalización. Según los niveles de p-S6(S240/244), la diana de mTORC1 S6K alcanzaba su máxima inhibición tras 4h sin Gmax, manteniendo estos niveles hasta 24h, dentro de los tiempos testados (Fig 11b). Curiosamente, los niveles de p-PRAS40(T246) alcanzan su máximo algo más tarde, en el tiempo de 8h, lo que apoya una activación compensatoria de la vía PIK3C1/Akt. Sin embargo, no pudimos observar diferencias significativas en LC3II, NBR1 o P62 que sugirieran una mayor degradación por autofagia.



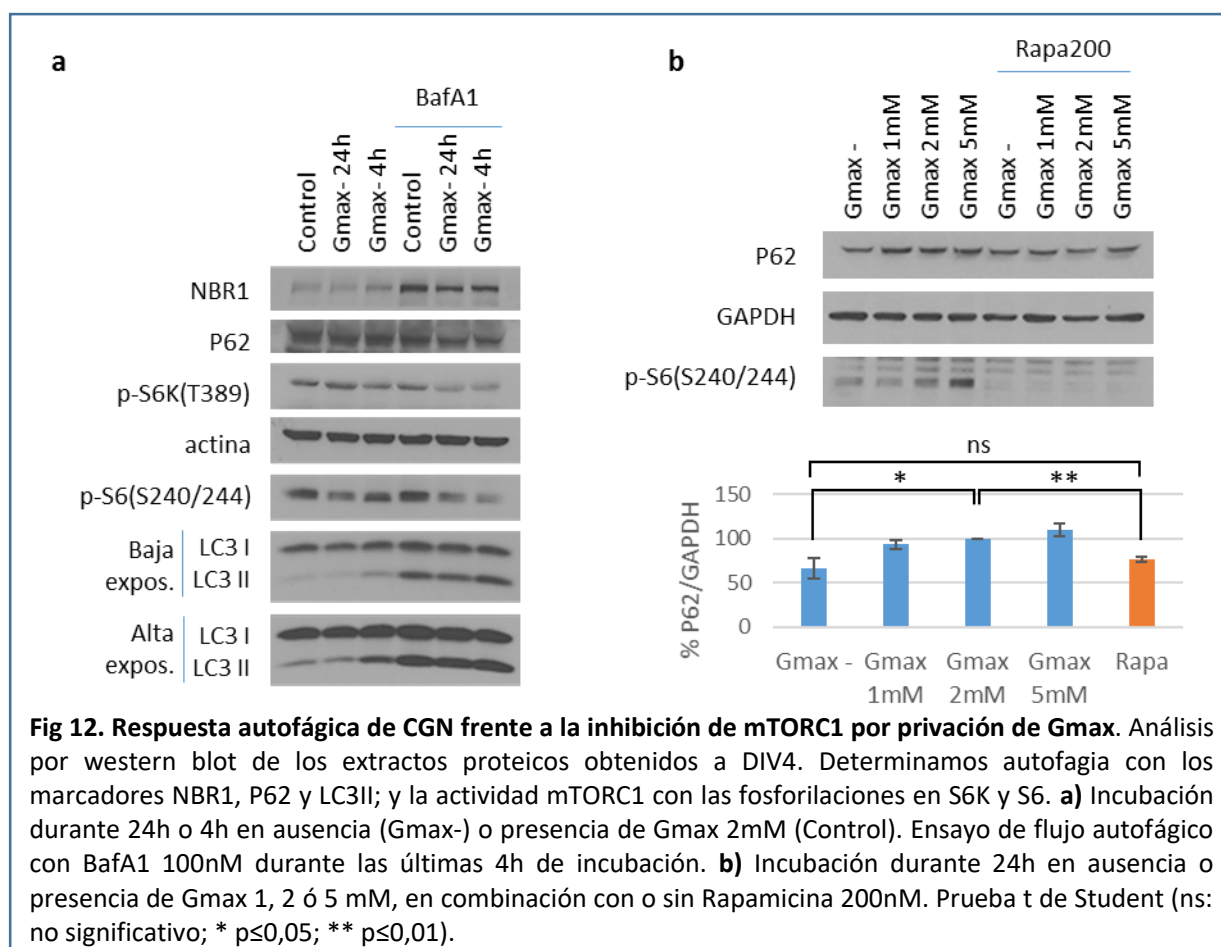
Realizamos un experimento de flujo a tiempos de 4h y 8h de privación de Gmax (Fig 11c). Aunque los niveles de NBR1, p62 y LC3II aumentaban con BafA1, no pudimos apreciar grandes variaciones del flujo autofágico respecto al control a ninguno de los tiempos testados. Nos preguntamos si esto podría deberse a la inhibición incompleta de mTORC1. Para comprobarlo, manteniendo las condiciones, realizamos el tratamiento combinatorio de privación de Gmax con

Rapamicina durante 4h para suprimir completamente la actividad de mTORC1 (Fig 11d). Aunque la inhibición de mTORC1 fuera mayor que sólo privando a las células de Gmax, la combinación con Rapamicina no generó un flujo autofágico mayor que el observado con Rapamicina en presencia de Gmax.

Para comprobar si el efecto observado en las células SH-SY5Y era representativo del proceso en neuronas, realizamos un experimento análogo en CGN. Privamos a las neuronas de Gmax durante 24h o 4h y analizamos el flujo autofágico añadiendo BafA1 en las últimas 4h (Fig 12a). Al igual que en las SH-SY5Y, en las CGN observamos por western blot una pequeña bajada en la actividad de la vía mTORC1, según P70S6K y S6. Análogamente, no percibimos modificaciones significativas del flujo autofágico a ningún tiempo de privación de Gmax, según los marcadores NBR1, P62 y LC3II (Fig 12a).

Para verificar la tasa de degradación mediada por autofagia, medimos los niveles del adaptador autofágico de larga vida media P62 tras someter las CGN durante 24h a diferentes concentraciones de Gmax (Fig 12b). Pudimos apreciar una ligera disminución de P62 en ausencia de Gmax equivalente a la observada con el tratamiento de Rapamicina. En estas condiciones la inhibición de la vía mTORC1 es máxima, según p-S6(S240/244). Esto sugiere que efectivamente el moderado efecto de la Rapamicina en autofagia en neuronas está mediado por la inhibición de mTORC1, y no se debe a un efecto secundario del compuesto.

Con todo esto, comprobamos que la inducción de autofagia mTORC1 dependiente se encuentra patente en sistemas neuronales con tasas de degradación altamente controladas, no siendo este efecto exclusivo del tratamiento con Rapamicina.



Concluimos que el ligero aumento de la degradación por autofagia en presencia de Rapamicina, mediado por la inhibición de mTORC1, es característico de los sistemas neuronales analizados, frente a los acusados flujos observados en líneas celulares, de carácter tumoral, descritas en la bibliografía (Tsvetkov et al., 2009; Kruger et al., 2012).

2.5. La disminución de A β secretado por neuronas tratadas con Rapamicina está mediada por autofagia.

Hemos comprobado que el tratamiento con Rapamicina correlacionaba por un lado con la disminución de la secreción de beta-amiloide, y por otro con una inducción de autofagia mTORC1 dependiente. Sin embargo, la Rapamicina sólo generaba un ligero aumento de flujo autofágico en nuestros sistemas neuronales pese a que la inhibición de mTORC1 fuese completa. Además, en los últimos años ha habido cierta controversia sobre el papel de la Rapamicina y la autofagia en la regulación del péptido beta-amiloide (Yu et al., 2005; Zhang et al., 2010). Puesto que mTORC1 constituye un nodo central en el equilibrio entre los procesos anabólicos y los catabólicos, su inhibición no sólo aumentaría la autofagia sino que también paralizaría mecanismos de síntesis. Por tanto, consideramos imprescindible clarificar si la autofagia está implicada en la eliminación del péptido A β o si por el contrario su disminución con Rapamicina deriva de otros procesos regulados por mTORC1.

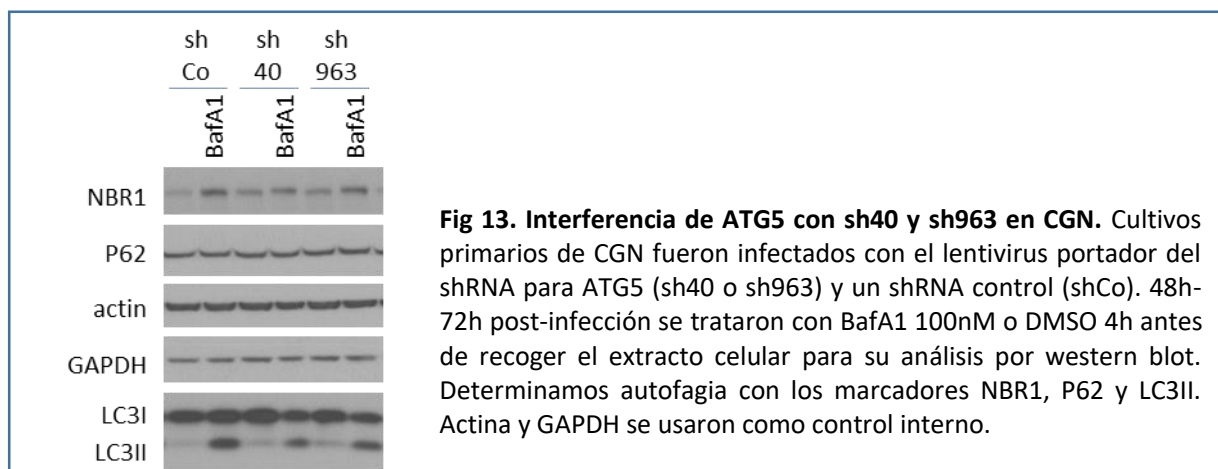
Con el fin de interceptar el desencadenamiento de la autofagia por Rapamicina, procedimos a la inhibición de las fases iniciales de la formación de autofagosomas.

2.5.1. Infección de CGN con lentivirus con ARN interferente frente a Atg5.

En primer lugar, tratamos de interferir la expresión de Atg5 con lentivirus portadores de ARN de interferencia, como hicimos con las SH-SY5Y (Fig 7). Previamente realizamos un alineamiento de secuencias entre el ARN mensajero codificante de la proteína Atg5 humano o de ratón, y nuestros interferentes sh40 o sh963, tal y como indicamos en materiales y métodos. Obtuvimos un alineamiento parcial principal de 18 nucleótidos (nts) con un 100% de identidad entre el interferente sh40 y los genes tanto de humano como de ratón, por lo que consideramos plausible su uso en células procedentes de ratón. No se tuvo la misma suerte en el caso del interferente sh963, que presentó un alineamiento parcial principal de 25 nts con una identidad del 92% con el transcrito humano, lo que podría explicar su mayor eficiencia en SH-SY5Y, pero tan solo un 72% de identidad en 18 nts de alineamiento parcial principal en el caso del ARN murino.

Tratamos de hacer una titulación de lentivirus adecuada para el cultivo probando a infectar durante 6h con polibreno o 24h sin polibreno, para reducir la muerte celular en lo posible. Entre las 48h y 72h postinfección, cuando la expresión del transgén es máxima, realizamos experimentos de flujo con Bafilomicina durante 4h. Acorde con los marcadores autofágicos NBR1 y LC3II, observamos una tendencia a un menor flujo autofágico de las neuronas transfectadas con el interferente de mejor alineamiento sh40 (imagen correspondiente a la mayor disminución de flujo obtenida; Fig 13). No obstante, no conseguimos resultados lo suficientemente relevantes para obtener una significativa

prevención de autofagia por Rapamicina. Decidimos entonces buscar otras estrategias para prevenir el inicio de la autofagia en CGN.



2.5.2. Análisis de compuestos inhibidores de las fases iniciales de la autofagia en SH-SY5Y.

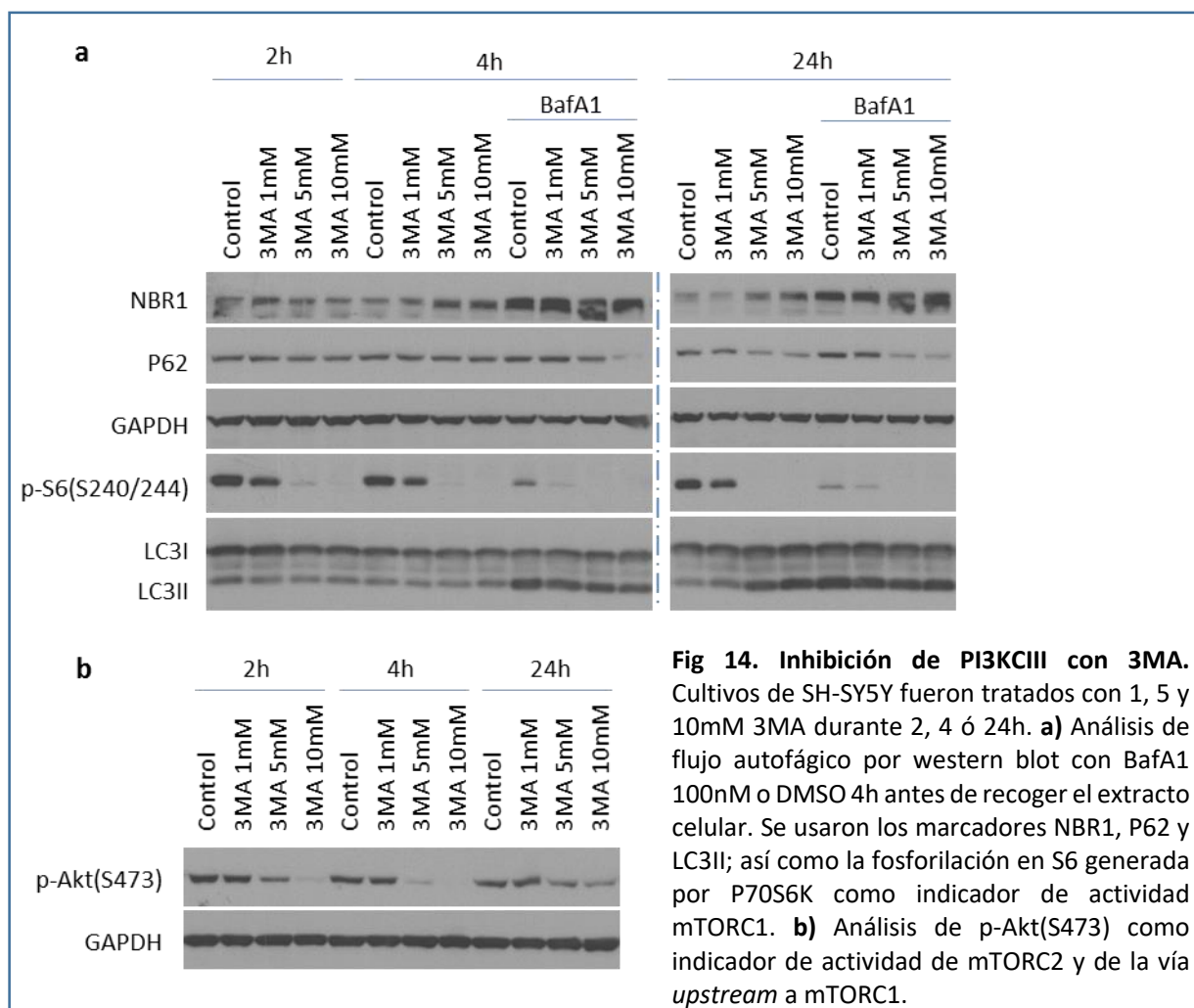
Con el fin de interceptar el desencadenamiento de la autofagia, procedimos a la inhibición de los complejos proteicos PI3KCIII y ULK, responsables de las fases iniciales de la formación de autofagosomas. Testamos los compuestos ampliamente utilizados 3-Metiladenina y Wortmanina (Klionsky et al., 2016), pero también Spautin-1 (Liu et al., 2011), VPS34-IN1 (Bago et al., 2014; Bilanges and Vanhaesebroeck, 2014) y MRT68921 (Petherick et al., 2015). Con el fin de analizar su efectividad, realizamos pruebas preliminares en SH-SY5Y.

Inhibidores de PI3KCIII: 3MA

La 3-Metiladenina (3MA) es un inhibidor de la PIK3C3/Vps34 ampliamente utilizado en la bibliografía. Testamos en SH-SY5Y diferentes concentraciones (1, 5 y 10mM) y tiempos (2, 4 y 24) (Fig 14). No encontramos diferencias significativas en los marcadores autofágicos P62, NBR1 y LC3II en ninguna condición respecto a la situación control (Fig 14a). Tampoco observamos cambios al analizar el flujo autofágico con BafA1 4h. En cambio, la 3MA generó una importante inhibición de la vía de mTORC1 desde tiempos tempranos según la fosforilación de S6 (Fig 14a). Medimos la fosforilación de Akt en S473 a diferentes tiempos y observamos que disminuía considerablemente a partir de concentraciones de 5mM de 3MA (Fig 14b). Esto sugiere que, a concentraciones no efectivas frente a la PIK3C3 en neuronas, la 3MA ya presenta una alta inespecificidad por otras quinasas como la ya descrita PI3KC1 (Klionsky et al., 2016).

Inhibidores de PI3KCIII: Wortmanina

Otro compuesto clásicamente utilizado para inhibir la PI3K de clase III es la Wortmanina, aunque también puede interferir con la PI3K de clase I (Klionsky et al., 2016). De manera similar, hicimos pruebas tratando las células con 100nM Wortmanina durante 4h, 24h y 48h (Fig 15a). Si bien a 4h parecía tener algo de efecto mirando los niveles de P62 y LC3II, a largo plazo desaparecía completamente. Además, a 24h la disminución de p-Akt(S473) ya mostraba una inhibición de la vía Akt/mTORC1 (Fig 15b), por lo que no aumentamos la dosis.



Inhibidores de PI3KCIII: Spautin-1

El compuesto Spautin-1 (*Specific and Potent Autophagy Inhibitor-1*) se describió como un inhibidor indirecto de la PIK3C3/Vps34. Spautin-1 inhibía las peptidasas de ubiquitina USP10 y USP13, encargadas de deubiquitar Beclin1 en el complejo PI3KCIII (Liu et al., 2011). Así, Spautin-1 promovía la acumulación de ubiquitinas y la consiguiente degradación de este complejo por el proteosoma, impidiendo la iniciación del proceso autofágico. Además, se ha descrito su eficiencia tanto a tiempos cortos como largos (Liu et al., 2011; Bouley et al., 2014; Chen et al., 2014).

Al no incidir directamente sobre la quinasa PIK3C3, decidimos probar Spautin-1 (SP) en nuestro cultivo de SH-SY5Y. El análisis por western blot del flujo autofágico en presencia de SP 10uM a diferentes tiempos (4, 24 y 48h) no mostró diferencias significativas respecto al control sin SP en ninguno de los marcadores NBR1, P62 o LC3II, los cuales seguían acumulándose en presencia de BafA1 (Fig 15c). Por tanto, consideramos que esta estrategia no constituía una inhibición muy eficiente en nuestro sistema neuronal.

Inhibidores de PI3KCIII: VPS34-IN1

El inhibidor VPS34-IN1 se caracterizó como el primer compuesto altamente selectivo por la subunidad PIK3C3/Vps34 del complejo PI3KCIII (Bago et al., 2014; Bilanges and Vanhaesebroeck, 2014). A diferencia de 3MA y de Wortmanina, el compuesto VPS34-IN1, con IC₅₀ de 25nM, sigue siendo altamente específico a concentraciones más elevadas (1uM), sin afectar a las PI3K-I o PI3K-II (Bago et al., 2014).

Testamos las concentraciones 0,1uM (Fig 15d) y 1uM (Fig 15e) para nuestro experimento de flujo autofágico. Observamos que dicho compuesto a baja concentración ya mostraba una respuesta inhibitoria clara respecto al control a cualquier tiempo, cuando se comparan los menores niveles de LC3II acumulados en presencia de BafA1 (Fig 15d). Esta diferencia era más notable a alta concentración en todos los tiempos testados, principalmente en los marcadores autofágicos LC3II y NBR1 (Fig 15e). La caída de flujo reflejaba una efectiva inhibición del inicio de la autofagia.

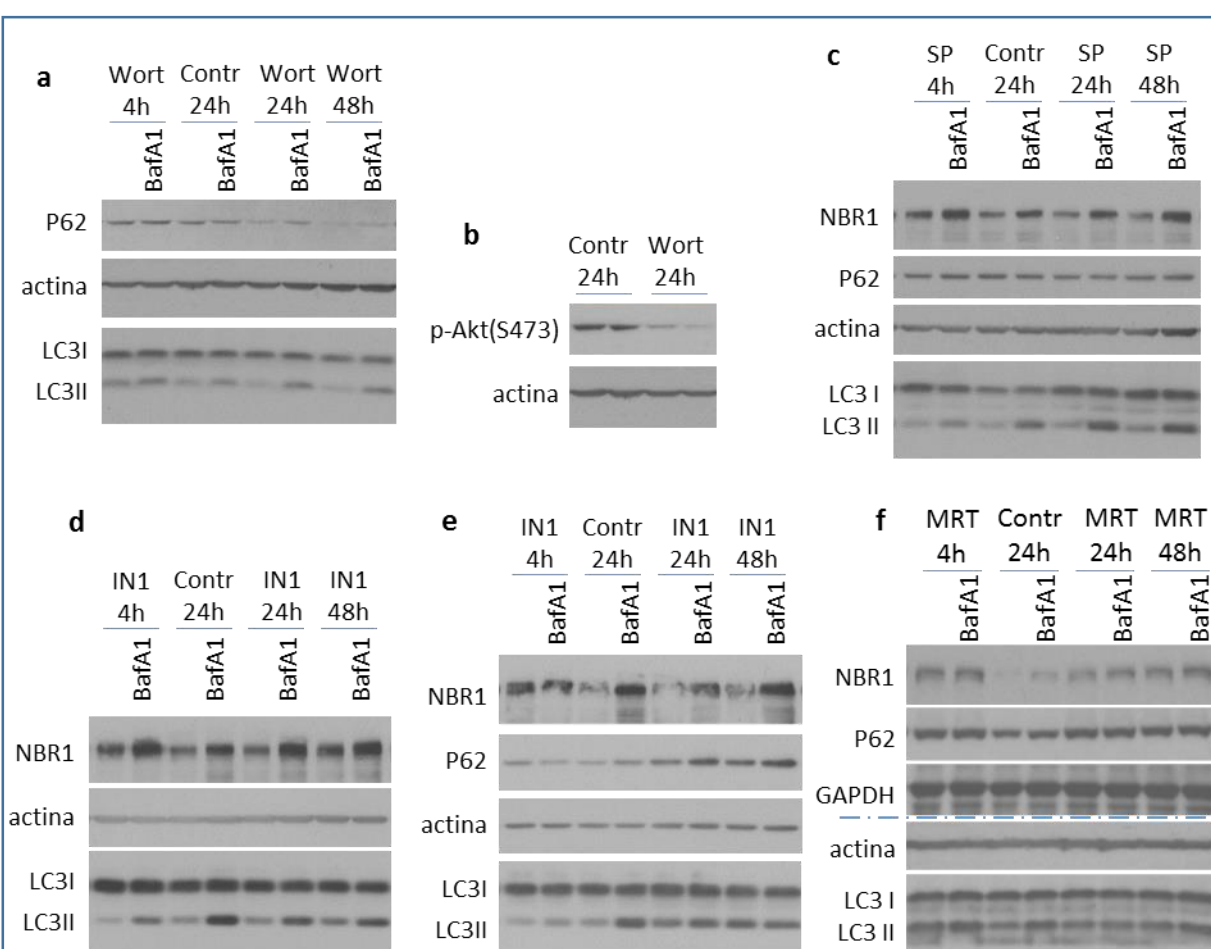


Fig 15. Análisis del flujo autofágico tras la inhibición de PI3KCIII con Wortmanina, SP e IN1, o de ULK con MRT. Cultivos de SH-SY5Y fueron tratados durante 4, 24 ó 48h con los diferentes inhibidores, y con BafA1 100nM o DMSO 2h antes de recoger el extracto celular para western blot (**a, c – f**). **a-b)** Wortmanina 100nM e inhibición inespecífica de Akt. **c)** Spautin-1 (SP) 10uM. **d-e)** VPS34-IN1 (IN1) 0,1uM (**d**) y 1uM (**e**). **f)** MRT68921 (MRT) 1uM. Se usaron los marcadores LC3II, NBR1 y P62 como medida de flujo autofágico; actina y GAPDH como controles internos.

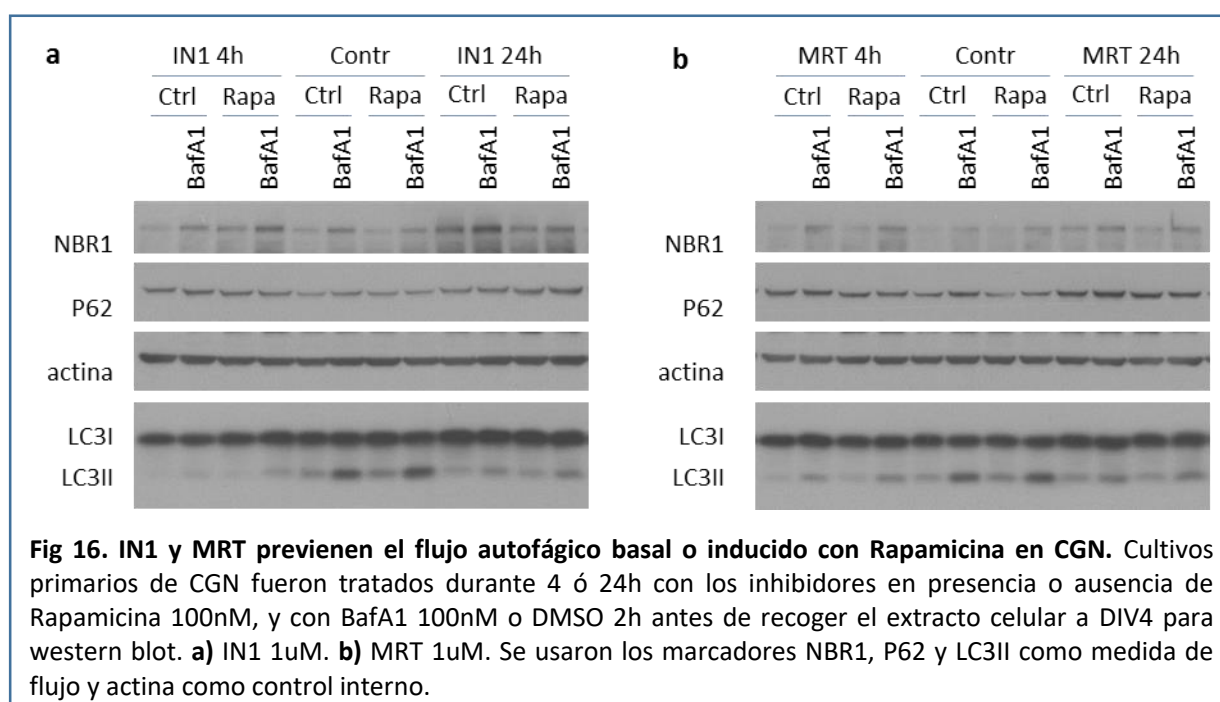
Inhibidores de ULK: MRT68921

Se identificó un potente inhibidor altamente específico de la quinasa ULK1/2, el compuesto MRT68921 (Petherick et al., 2015). Esta quinasa es un componente esencial del complejo ULK, participante en la formación inicial de los autofagosomas junto con el complejo PI3KCIII. Mientras que PI3C3/Vps34 participa también en la ruta endocítica, se piensa que ULK1 es específica para autofagia, por lo que su inhibición suponía una estrategia de interés para confirmar el resultado observado con VPS34-IN1.

El inhibidor MRT68921 presenta una IC₅₀ de 2,9nM para ULK1 y de 1,1nM para ULK2. Empleamos una concentración de 1uM para la inhibición de ULK1/2 (Fig 15f). Observamos una clara disminución de flujo autofágico en todos los tiempos ensayados al analizar los niveles de LC3II en presencia/ausencia de BafA1 pero también apreciamos una menor degradación de los adaptadores NBR1 y P62, reflejando una efectiva inhibición del inicio de la autofagia (Fig 15f).

2.5.3. IN1 y MRT previenen el flujo autofágico basal e inducido por Rapamicina en CGN.

De los datos en SH-SY5Y concluimos que tanto el inhibidor específico de la quinasa PI3C3/Vps34 IN1 como el de ULK1/2 MRT68921 generaban una inhibición apreciable de la inducción de autofagia. Para constatar la efectividad de estos compuestos en neuronas primarias, realizamos cultivos de CGN. Testamos ambos compuestos a una concentración elevada de 1uM a 4h y 24h, tanto en condiciones de autofagia basal (DMSO) como inducida con Rapamicina. Con ambos inhibidores y a ambos tiempos pudimos observar una clara disminución del flujo autofágico, ya que la característica acumulación de LC3II en presencia de Bafilomicina era menor (Fig 16a, b). Este resultado no era tan evidente al observar los niveles del adaptador autofágico NBR1. No obstante, sí se apreció la paralización del aclaramiento de P62 propio de los tratamientos prolongados con Rapamicina.

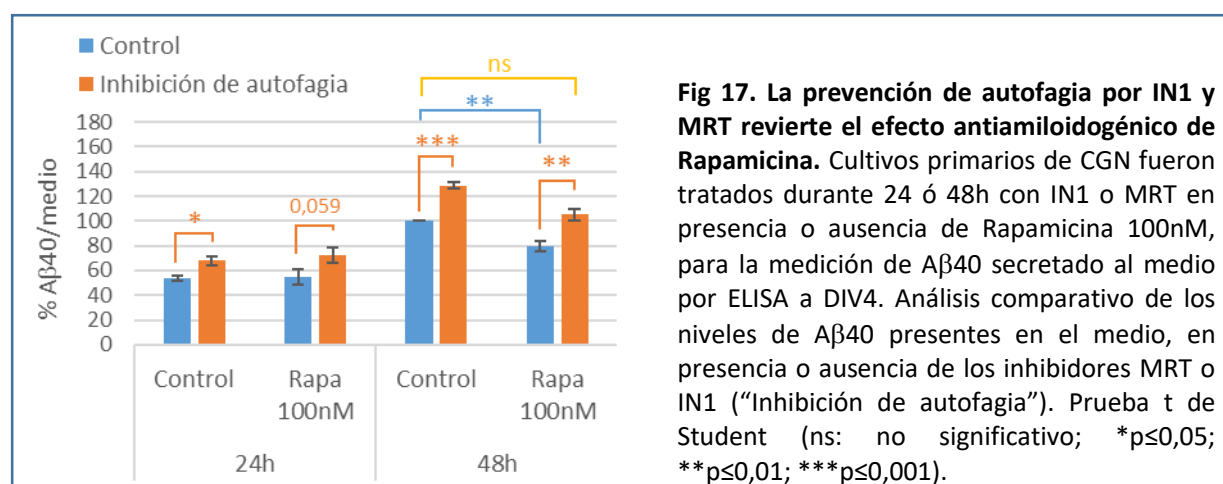


2.5.4. La inhibición del inicio de la autofagia revierte el efecto anti-amiloidogénico de la Rapamicina en CGN.

Procedimos entonces a comprobar que el efecto anti-amiloidogénico de la Rapamicina estaba mediado por la presunta degradación de A β por autofagia. Si fuera el caso, la inhibición de la autofagia por los compuestos MRT o IN1 debería generar el efecto contrapuesto a la Rapamicina, aumentando los niveles de A β secretados.

Tratamos cultivos de CGN transgénicas APP/PS1 con Rapamicina 100nM durante 24h y 48h en presencia de los inhibidores autofágicos MRT68921 o VPS34-IN1 a 1uM. Sin embargo, al tratarse de cultivos a baja densidad, la combinación de estos inhibidores con Rapamicina generó cierta toxicidad a 48h (datos no mostrados), por lo que comprobamos su efecto a dosis más bajas de 0,1 y 0,5uM. De cada experimento independiente, seleccionamos aquellas concentraciones donde la combinación de tratamientos no generaba toxicidad, según el test de viabilidad Coomassie realizado en paralelo, y medimos los niveles de A β 40 secretados al medio por ELISA. Ambos inhibidores del inicio de la autofagia MRT e IN1 no sólo aumentaban la cantidad de A β secretado en condiciones basales tanto a 24h como a 48h, sino que además eran capaces de revertir la disminución provocada por Rapamicina a 48h a niveles control (Fig 17). Tanto MRT como IN1, a diferentes concentraciones, generaron niveles de secreción de A β 40 análogos, según estuvieran en combinación o no con Rapamicina, en experimentos independientes. Puesto que la diana de cada inhibidor, MRT o IN1, es un complejo proteico diferente, ULK o PI3KCIII, la similitud de sus efectos apoya que dicho aumento de A β se deba al mecanismo en común, el bloqueo del inicio de la autofagia. Por tanto, consideramos este grupo de resultados homogéneos como el conjunto *inhibidor de la inducción de autofagia* y realizamos un análisis estadístico global frente a la autofagia basal o inducida (Fig 17).

Así, confirmamos que la Rapamicina reducía los niveles de A β por su capacidad de inducir autofagia, mientras que la inhibición de la misma aumentaba su secreción.



2.6. Conclusiones

- Rapamicina tiene un efecto antiamiloidogénico tanto en cerebro de ratones adultos como en cultivos primarios de CGN de nuestro modelo murino de Alzheimer APP/PS1.
- Rapamicina es capaz de inducir autofagia aumentando ligeramente la tasa de degradación en las células neuronales analizadas.
- La inhibición de mTORC1 por mecanismos fisiológicos genera una ligera inducción de autofagia análoga a la observada con Rapamicina. Esto sugiere que el discreto aumento en autofagia por inhibición de mTORC1 es una propiedad intrínseca al linaje neuronal y no una particularidad de la Rapamicina en el mismo.
- El efecto antiamiloidogénico de la Rapamicina está mediado por el ligero aumento del flujo autofágico, ya que la prevención de este mecanismo de degradación revierte dicha disminución de A β .

3. Modulación de la autofagia en neuronas a través de la vía dependiente de AMPK.

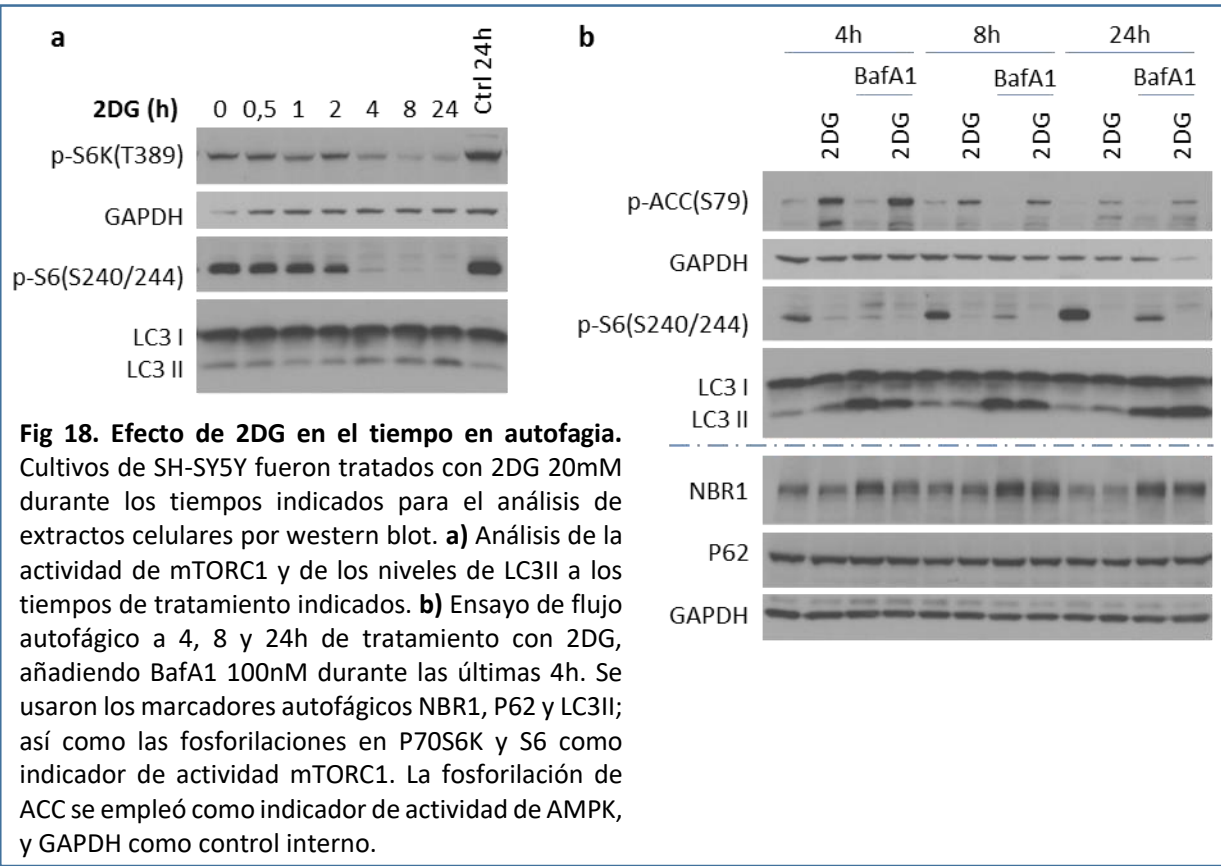
Otra ruta reguladora de la inducción de autofagia es la vía AMPK. Como describimos en la introducción, la quinasa AMPK juega un papel doble en este proceso. Por un lado, AMPK favorece la activación del complejo ULK1 al fosforilar la subunidad ULK1 (en S555 entre otras) y al impedir su inhibición por mTORC1 (al fosforilar Raptor en S792 y TSC2 en S1387 (Kim et al., 2011). Por otro lado, AMPK favorece la configuración pro-autofágica del complejo PI3KCIII mediante la fosforilación de Beclin-1 y subsecuente interacción con Atg14L o UVRAG (Kim et al., 2013).

Para el estudio de la modulación de autofagia por AMPK empleamos diferentes estrategias, como la modificación del metabolismo de la glucosa o el uso de compuestos químicos inhibidores y activadores de esta quinasa.

3.1. Activación de AMPK con 2DG.

El compuesto 2-desoxi-D-glucosa (2DG) es un análogo de la glucosa que, tras su internalización y fosforilación por la glucosa quinasa, la célula no es capaz de procesar, dando lugar al bloqueo de la glucólisis, disminución de los niveles de ATP y activación de AMPK (Zhang et al., 2014).

Para analizar el efecto de 2DG, empleamos la línea celular SH-SY5Y y añadimos 20mM de 2DG a diferentes tiempos. Observamos una activación de la AMPK desde los tiempos más tempranos, al aumentar la fosforilación de su sustrato ACC(S79) (dato no mostrado), aunque la consiguiente inhibición de la vía mTORC1 se hizo patente a partir de las 4h de tratamiento, según p-P70S6K(T389) y p-S6(S240/244) (Fig 18a). Los niveles de LC3II no mostraron un incremento significativo de AVs.



Realizamos estudios de flujo con Bafilomicina A1 100nM a 4, 8 y 24h de tratamiento con 2DG. El análisis por western blot no mostró un aumento de flujo por 2DG al comparar los niveles de LC3II con y sin BafA1 (Fig 18b). No se observó una disminución de P62, ni una variación de NBR1 con BafA1, que indicasen un aumento de la degradación por autofagia.

Decidimos realizar un estudio comparativo empleando como control positivo de inducción de autofagia Rapamicina y Calpeptina, descrito como inductor independiente de mTOR y AMPK (Sarkar et al., 2009). Empleamos dos dosis de BafA1 para descartar efectos secundarios de este compuesto. Así, tratamos las células durante 4h con 2DG 20mM, Calpeptina 5uM o Rapamicina 200nM, y BafA1 a 10 o 100nM (Fig 19). Observamos que la gran acumulación de AVs (LC3II) en presencia de 100nM Bafilomicina presentaba pocas variaciones entre tratamientos (Fig 19a, b). Sin embargo, la concentración menor de Bafilomicina (10nM) generaba una acumulación de LC3II, NBR1 y P62 más moderada permitiendo la mejor apreciación de diferencias de flujo entre los tratamientos (Fig 19a-d), además de una menor inhibición de mTORC1 según p-P70S6K(T389) y p-S6(S240/244) (Fig 19a). Curiosamente, en comparación con LC3II, la acumulación del adaptador autofágico NBR1 apenas difería entre las concentraciones de BafA1 independientemente del tratamiento, al igual que P62 (Fig19a-d). Como controles de actividad, observamos que únicamente 2DG aumentaba la actividad de AMPK según p-ACC(S79), y consecuentemente inhibía parcialmente la vía mTORC1 según p-P70S6K(T389) y p-S6(S240/244) (Fig 19a). Rapamicina provocaba una inhibición total de la vía mTORC1, mientras que Calpeptina no presentaba ningún efecto sobre la misma respecto al control. Observamos la capacidad de la Rapamicina de aumentar ligeramente el flujo autofágico según el análisis de LC3II, NBR1 y P62 (Fig 19a-d). En el caso de la Calpeptina, también se observó un ligero aumento en la tasa de degradación por autofagia según NBR1 y P62, junto con un aumento de los niveles de basales de LC3II. No obstante, la acumulación de LC3II con BafA1 disminuyó en presencia de Calpeptina (Fig 19b). Al tratar con 2DG, no se detectaron diferencias respecto al control en el flujo de AVs según LC3II. Sí se pudo apreciar una tendencia a disminuir la tasa de degradación según NBR1 (Fig 19c), y en menor medida P62 (Fig 19d). De esta manera pudimos concluir que la 2DG no sólo no inducía autofagia en nuestro sistema neuronal, sino que incluso podría disminuirla.

Nos preguntamos si una actividad remanente de mTORC1 podría estar impidiendo la inducción de autofagia dependiente de AMPK en el caso de 2DG. Por tanto, tratamos las células con 2DG en combinación con Rapamicina. Aplicamos los tratamientos a corto (4h) y a largo plazo (24h), por si su efecto difería con el tiempo, y añadimos 100nM BafA1 4h antes del final del experimento para medir el flujo de autofagia. Analizando LC3II, NBR1 y P62, observamos que la 2DG no era capaz de aumentar el flujo de autofagia de manera significativa, ni la consiguiente degradación proteica, aunque se tratara junto con Rapamicina (Fig 20a). Por el contrario, la 2DG parecía atenuar el flujo inducido por Rapamicina según los niveles de LC3II y NBR1 con y sin BafA1. Debido a estos datos, descartamos que la ineficiente autofagia se debiera a una insuficiente inhibición de mTORC1 por 2DG. Repetimos el experimento a 4h con 10 nM de BafA1 (Fig 20b), y obtuvimos resultados análogos a los anteriores con 100nM de BafA1 (Fig 20a). Comprobamos que este efecto era similar, y por tanto extrapolable, en cultivos primarios de CGN tratados durante 24h con 2DG 20mM y/o Rapamicina y analizado el flujo autofágico con BafA1 100nM 4h (Fig 20c).

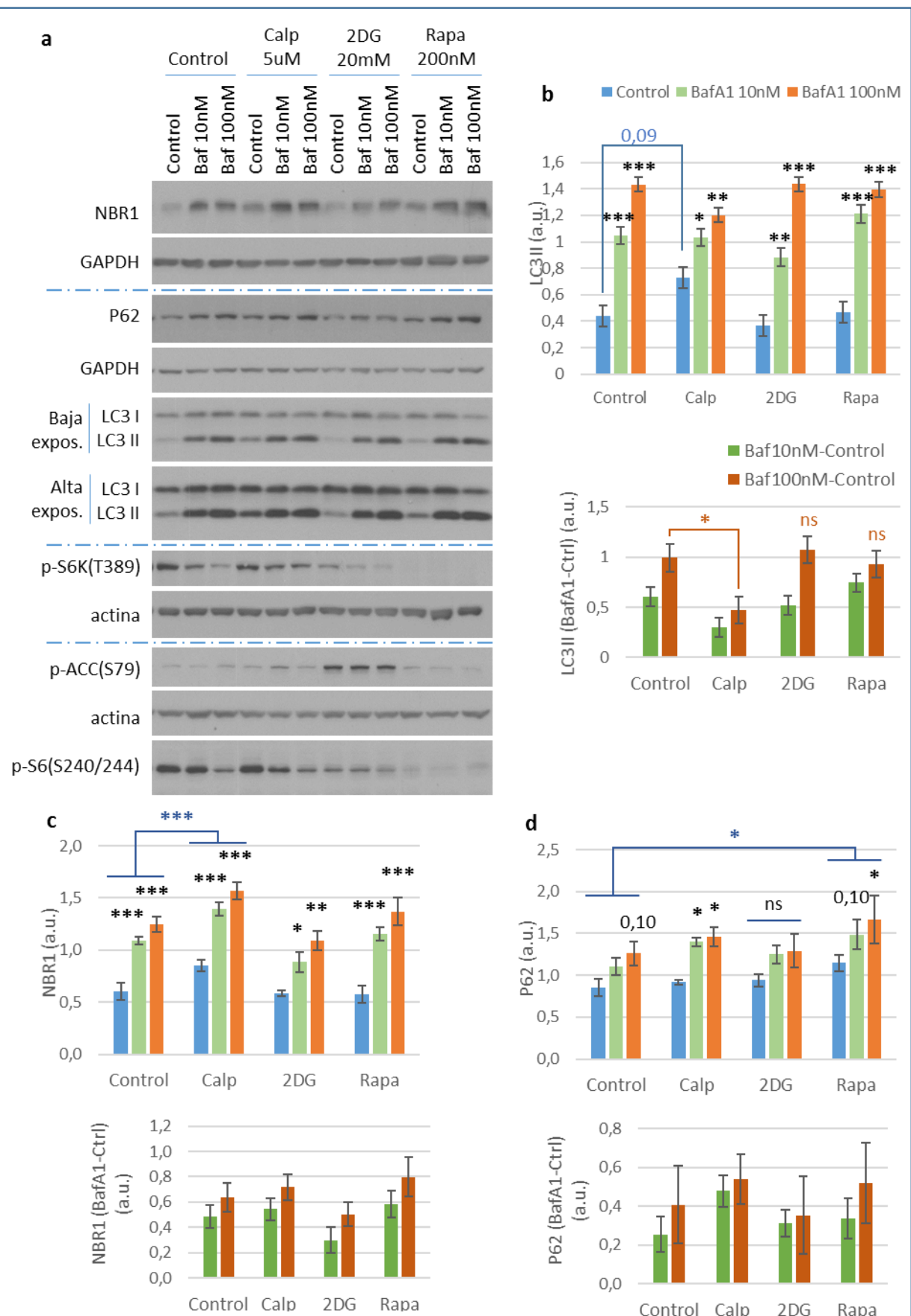
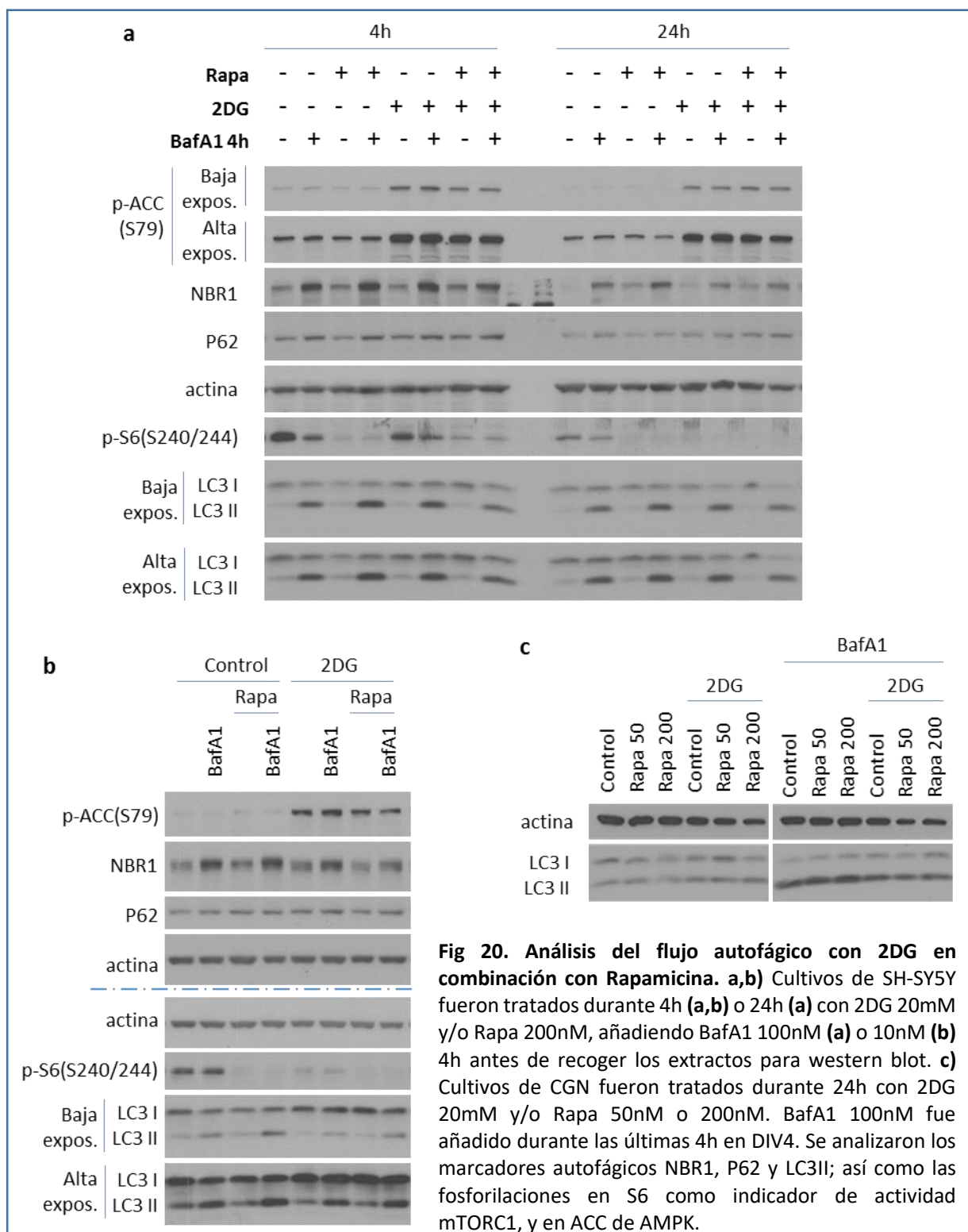


Fig 19. Análisis comparativo de flujo autofágico entre 2DG y los inductores de autofagia Calpeptina (Calp) y Rapamicina (Rapa). (Leyenda en página siguiente)

Fig 19. (Figura en página anterior)

Análisis comparativo de flujo autofágico entre 2DG y los inductores de autofagia Calpeptina (Calp) y Rapamicina (Rapa). Cultivos de SH-SY5Y fueron tratados durante 4h con 2DG 20mM, Calp 5uM o Rapa 200nM, en presencia/ausencia de BafA1 10 ó 100nM. Análisis de extractos celulares por western blot **(a)**. Análisis estadístico de los niveles de los marcadores autofágicos LC3II **(b)**, NBR1 **(c)** y P62 **(d)**, normalizados con respecto al control interno (ANOVA de dos factores; ns: no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Se usaron las fosforilaciones en P70S6K y S6 como indicador de actividad mTORC1, y en ACC de AMPK. Como controles internos se usaron actina y GAPDH.



3.2. Activación de AMPK con AICAR o Metformina.

Con objeto de descartar que la falta de inducción de autofagia por 2DG fuera debida a la naturaleza de este compuesto, empleamos otros dos fármacos descritos como activadores de AMPK en la bibliografía: AICAR y Metformina (Corton et al., 1995; Podhorecka et al., 2017).

Para comprobar el rango de uso en células de linaje neuronal, realizamos curvas de concentración de cada compuesto, partiendo de las descritas en la bibliografía, y de tiempos (1h, 4h y 24h) en cultivos de SH-SY5Y, empleando p-ACC(S79) como indicador de actividad AMPK (Datos no mostrados). De este experimento piloto, seleccionamos las concentraciones de partida 0,5mM para AICAR y 2,5mM para Metformina, las cuales ya eran capaces de activar AMPK a todos los tiempos testados.

Realizamos en SH-SY5Y un experimento de flujo autofágico a 4h de tratamiento con inhibición de la degradación lisosomal parcial (Baf 10nM) y total (Baf 100nM) (Fig 21a). Tanto AICAR como Metformina activaban AMPK, según se puede inferir de p-ACC(S79). De acuerdo a una mayor actividad de AMPK, generaron la consiguiente inhibición de mTORC1, según p-P70S6K(T389) y p-S6(S240/244). Al comparar los niveles de LC3II y NBR1 basales frente a los acumulados con BafA1, no observamos un aumento del flujo con AICAR o Metformina como ocurría con Rapamicina (Fig 21a).

Para comprobar que la falta de inducción de autofagia no se debía a una inhibición insuficiente de mTORC1, tratamos las células con AICAR o Metformina en combinación con Rapamicina durante 4h (Fig 21b). Aunque la Rapamicina por sí sola era capaz de inducir autofagia, el tratamiento conjunto con AICAR o Metformina no fue capaz de aumentar el flujo respecto al basal, de manera parecida a lo observado con 2DG.

Para comprobar que este efecto de AICAR y Metformina en SH-SY5Y era generalizable a neuronas primarias, realizamos un experimento análogo en cultivos de CGN (Fig 22). AICAR y Metf activaron notablemente AMPK, según su fosforilación en T172 y p-ACC(S79), mientras que la reducción de NBR1 sólo fue destacable en presencia de Rapamicina. La incubación con BafA1 reveló un aumento del flujo autofágico discreto según LC3II sólo con Rapamicina, el cual disminuía al combinarla con AICAR y más notablemente con Metf (Fig 22).

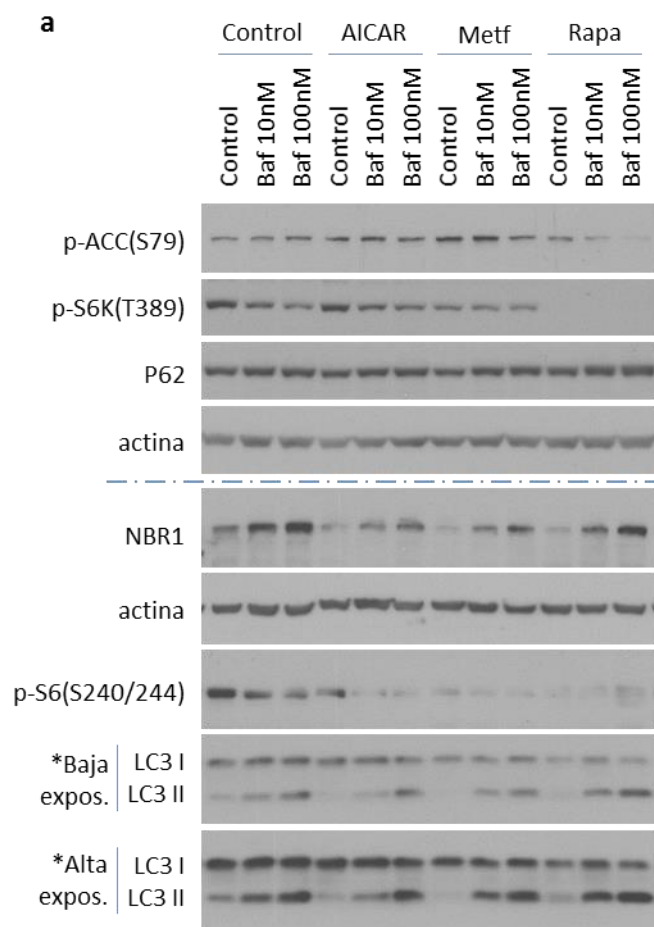
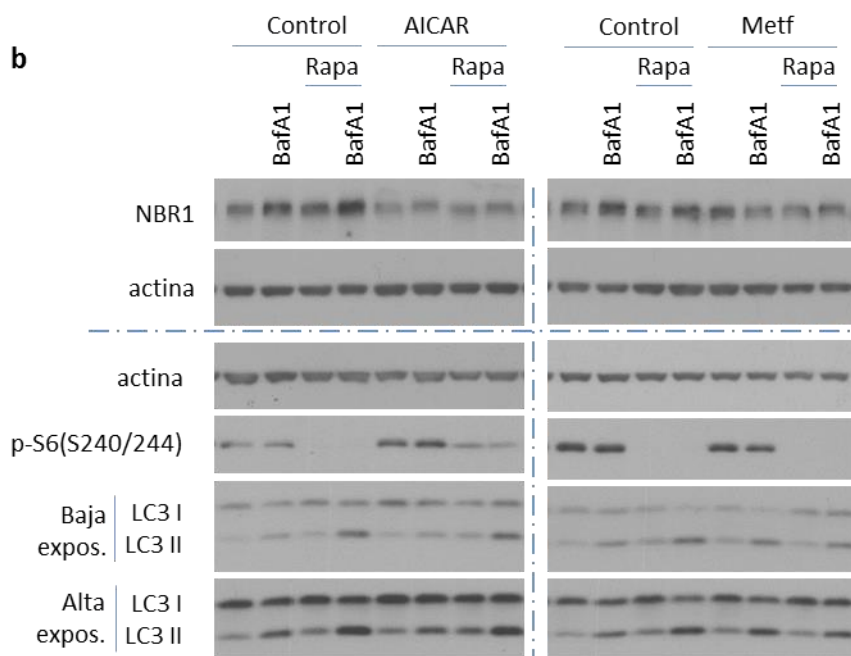
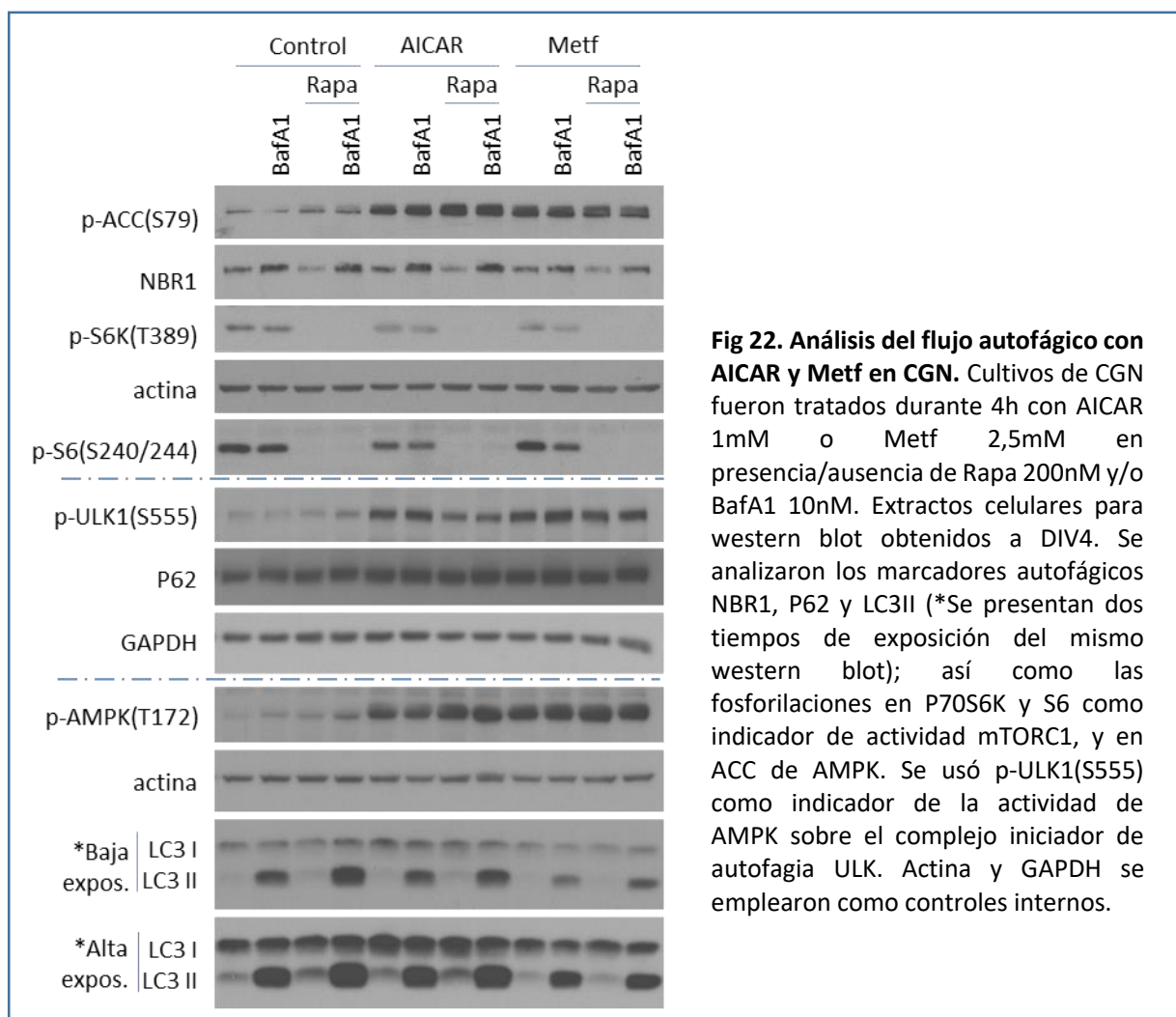


Fig 21. Análisis del flujo autofágico con AICAR y Metformina (Metf). Cultivos de SH-SY5Y fueron tratados durante 4h con AICAR 0,5mM o Metf 2,5mM y/o Rapa 200nM **(a,b)**, en presencia/ausencia de BafA1 100nM **(a)** o 10nM **(a,b)**. Análisis de extractos celulares por western blot. Se analizaron los marcadores autofágicos NBR1, P62 y LC3II (*Se presentan dos tiempos de exposición del mismo western blot); así como las fosforilaciones en P70S6K y S6 como indicador de actividad mTORC1, y en ACC de AMPK. Actina se empleó como control interno.



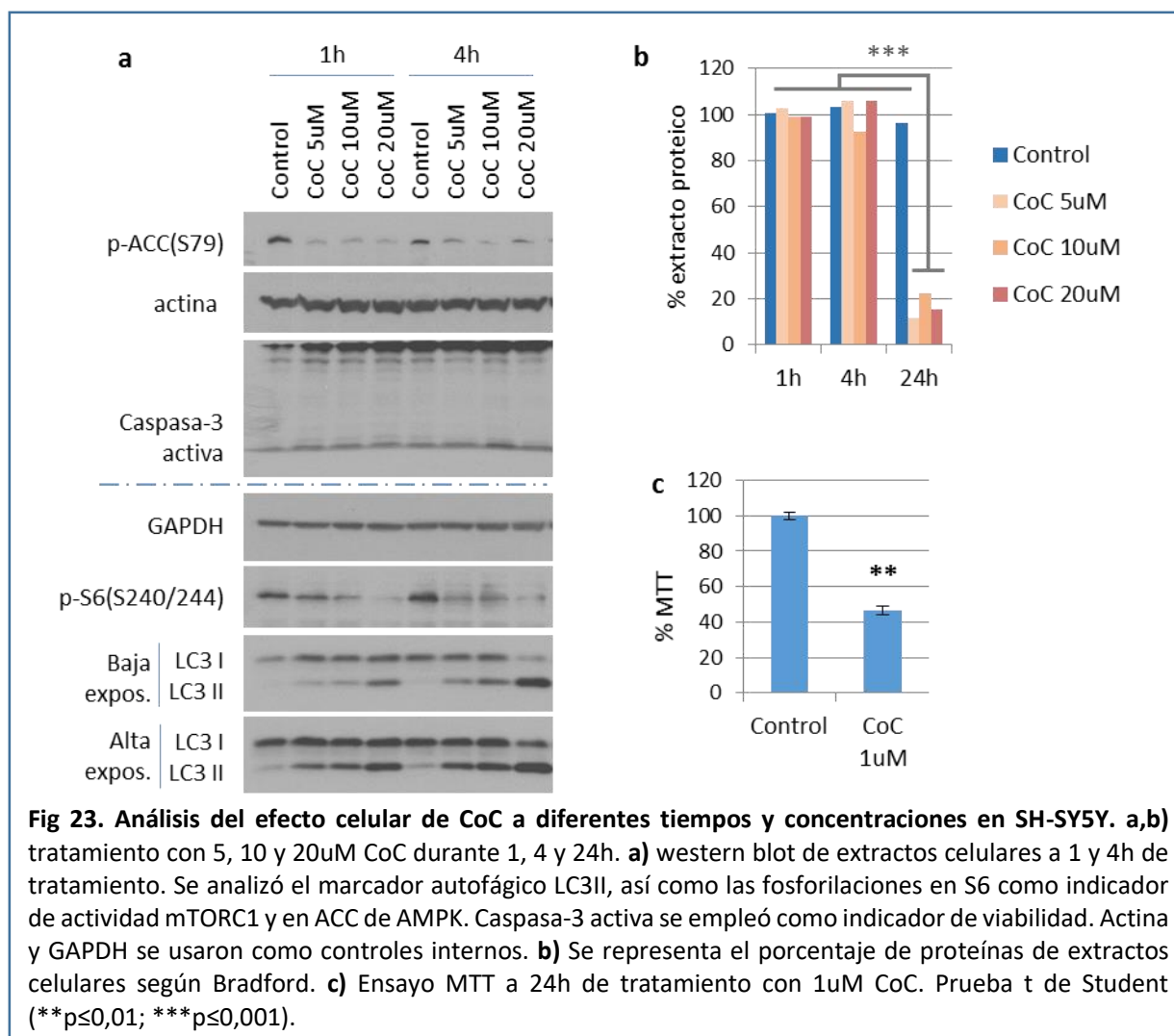


3.3. Inhibición de AMPK con el Compuesto C.

Puesto que los activadores de AMPK disminuyeron la eficiencia del flujo autofágico, nos preguntamos cuál sería el efecto de inhibir AMPK. Para ello empleamos el inhibidor de la AMPK *Dorsomorphin*, comúnmente conocido como Compuesto C (CoC).

Ensayamos varias concentraciones de CoC a diferentes tiempos en SH-SY5Y, siendo capaz de inhibir la actividad de la AMPK, según p-ACC(S79), en todos los casos (Fig 23a). No obstante, a largo plazo (24h) provocaba una gran pérdida celular con una reducción de más del 80% de proteína total medida por Bradford (Fig 23b). Confirmamos este efecto a largo plazo en un ensayo MTT a 24h de tratamiento con una concentración aún menor de 1uM CoC, que generaba una pérdida de viabilidad de más del 50% (Fig 23c).

Curiosamente, a corto plazo (1 y 4h), sin modificar los niveles de caspasa-3 activa, CoC generaba una inhibición de mTORC1 y un aumento de los niveles de LC3II mayor con el tiempo y la concentración (Fig 23a). Acorde con esto, se ha descrito que el CoC inducía autofagia en determinadas células tumorales por inhibición de la ruta Akt/mTORC1 de manera independiente a la inhibición de AMPK (Vucicevic et al., 2011).



3.3.1. CoC bloquea el flujo autofágico de manera independiente a la vía mTORC1.

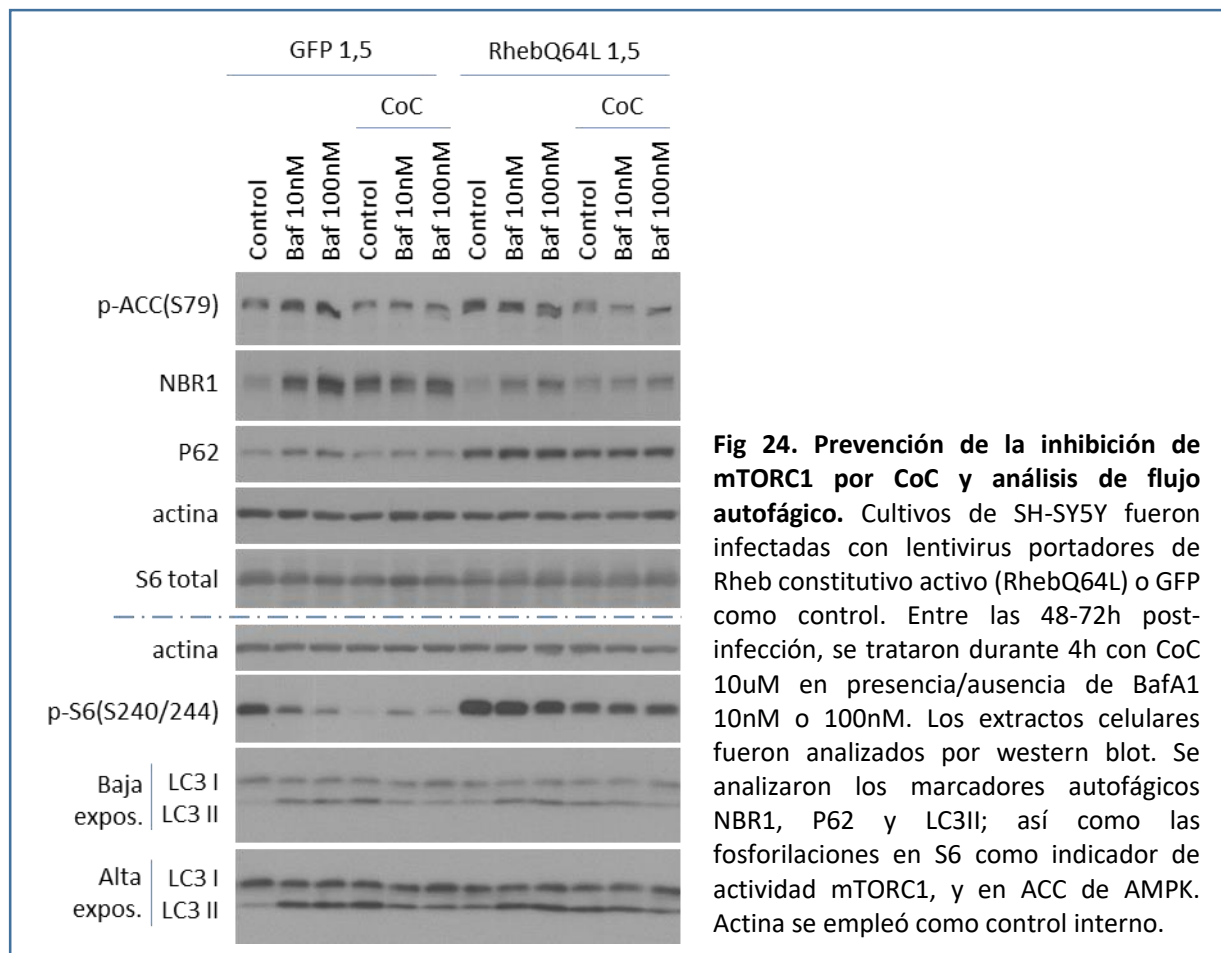
Quisimos comprobar si el aumento de LC3II observado en SH-SY5Y por CoC se debía a una inhibición de mTORC1, independiente de AMPK, y por lo tanto podría estar relacionado con la inducción autofágica descrita (Vucicevic et al., 2011). Para ello, procedimos a revertir exclusivamente la inhibición de mTORC1 interceptando la vía Akt/mTORC1 al sobreexpresar el mutante constitutivamente activo de Rheb (RhebQ64L), o GFP como control, en SH-SY5Y por infección lentiviral. Entre las 48-72h post-infección, cuando la expresión de los transgenes era máxima, hicimos un experimento de flujo con CoC 10uM y la inhibición lisosomal completa (100nM BafA1) o parcial (10nM BafA1) a 4h de tratamiento (Fig 24).

La sobreexpresión de RhebQ64L provocó una mayor actividad de la vía mTORC1, según el aumento de p-S6(S240/244). Esto generó una menor tasa de degradación por autofagia, como se puede apreciar con la menor variación de NBR1 y LC3II con BafA1, y por consiguiente la acumulación del adaptador autofágico de larga vida media P62 (Fig 24).

Por otro lado, observamos que con CoC los niveles de LC3II, NBR1 y P62 no se veían incrementados por BafA1, lo que sugiere un bloqueo del sistema. RhebQ64L revirtió la inhibición de

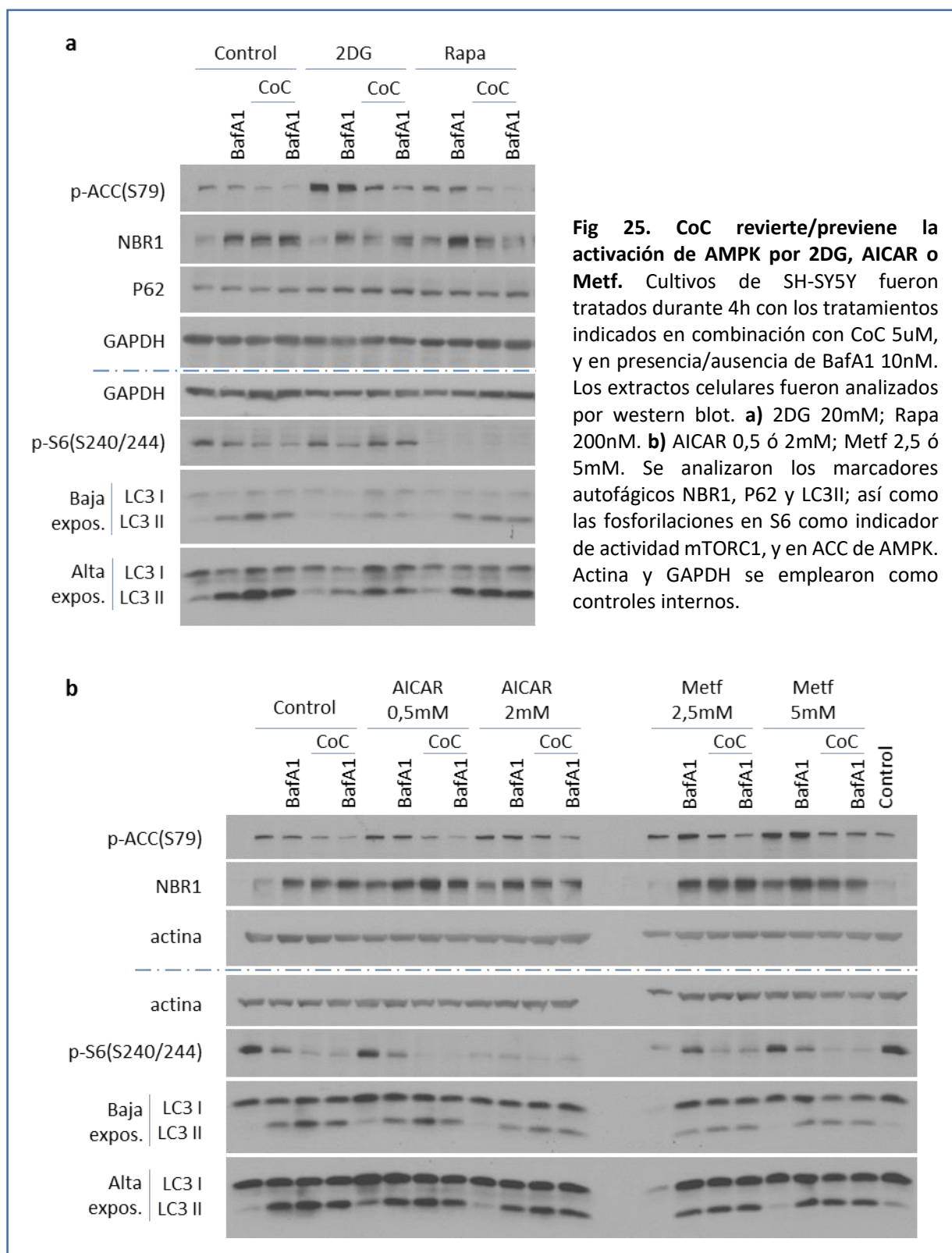
mTORC1/P70S6K por CoC, que seguía inhibiendo AMPK. Sin embargo, RhebQ64L no modificó el efecto de CoC sobre LC3II, NBR1 o P62, cuyos niveles permanecían constantes al añadir BafA1 (Fig 24).

De todo ello pudimos concluir que el efecto autofágico asociado al CoC estaba mediado por la inhibición de AMPK y no por mTORC1, en contraposición a lo descrito (Vucicevic et al., 2011).



3.3.2. CoC revierte la activación de AMPK por 2DG, AICAR o Metf.

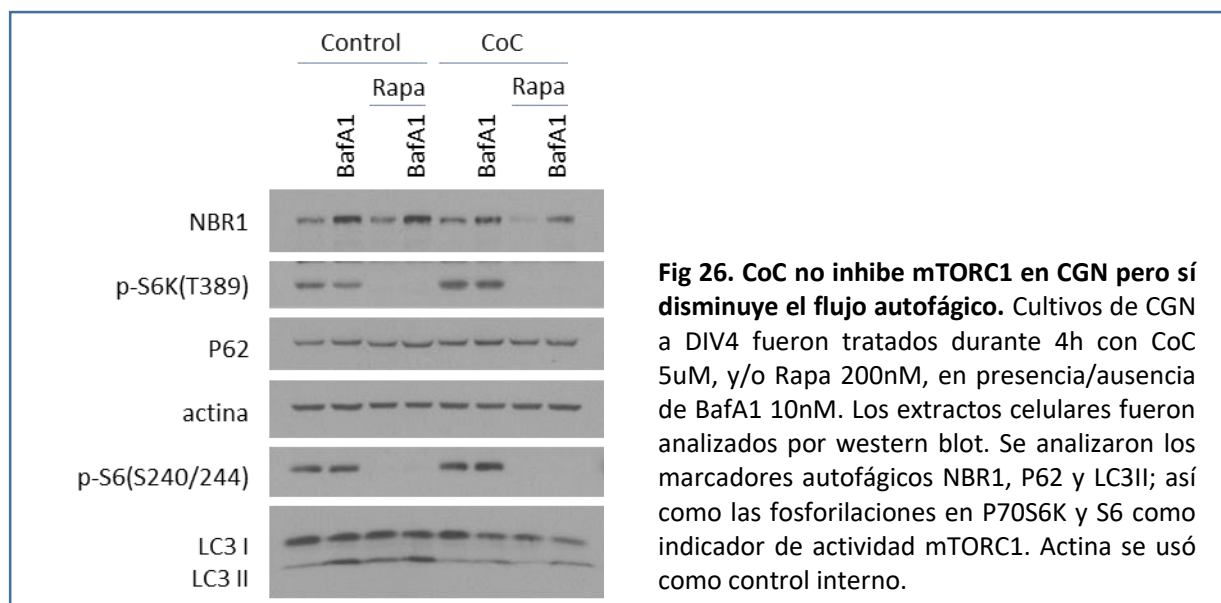
Para comprobar si el efecto de CoC depende del estatus de actividad de AMPK, realizamos un experimento de flujo a 4h de tratamiento en presencia de 2DG o Rapamicina (Fig 25a). Como control de actividad AMPK monitorizamos p-ACC(S79) que disminuía con CoC, revirtiendo el aumento por 2DG. Además, observamos una parada del flujo autofágico con CoC 5uM, con un mantenimiento de los niveles de LC3II y NBR1 al añadir BafA1, tanto en condiciones control como en combinación con Rapamicina, lo que sustenta la independencia de mTORC1 en este proceso. Este efecto también se pudo apreciar en combinación con 2DG, si bien la acumulación de LC3II con CoC y BafA1 fue más discreta (Fig 25a). Análogamente, comprobamos que el tratamiento con CoC era capaz de revertir la activación de AMPK por AICAR o Metformina en cultivo de SH-SY5Y, causando el bloqueo de flujo descrito (Fig 25b).



3.3.3. CoC no modifica la señalización de mTORC1 y disminuye el flujo autofágico en CGN

Para comprobar si estos datos eran extrapolables a neuronas primarias, hicimos un experimento similar en CGN tratándolas con CoC 5uM durante 4h y analizamos el flujo autofágico con BafA1 10nM (Fig 26). En contraste con las células de neuroblastoma, en CGN no se apreció un aumento

de los niveles de LC3II o NBR1 en presencia de CoC. No obstante, la combinación con BafA1 sí que reveló una disminución del flujo autofágico con menor tasa de degradación con CoC respecto al control. Por otro lado, a diferencia de en SH-SY5Y, en CGN no apreciamos una inhibición de mTORC1/P70S6K por CoC. Sin embargo, el efecto en el flujo autofágico de CoC solo o en presencia de Rapamicina era similar (Fig 26), lo que permitió descartar que los mayores niveles de LC3II y NBR1 observados en SH-SY5Y fueran debidos al efecto diferencial en mTORC1 (Fig 24). Por tanto, las diferencias entre ambos sistemas neuronales han de explicarse por un mecanismo independiente de mTORC1.



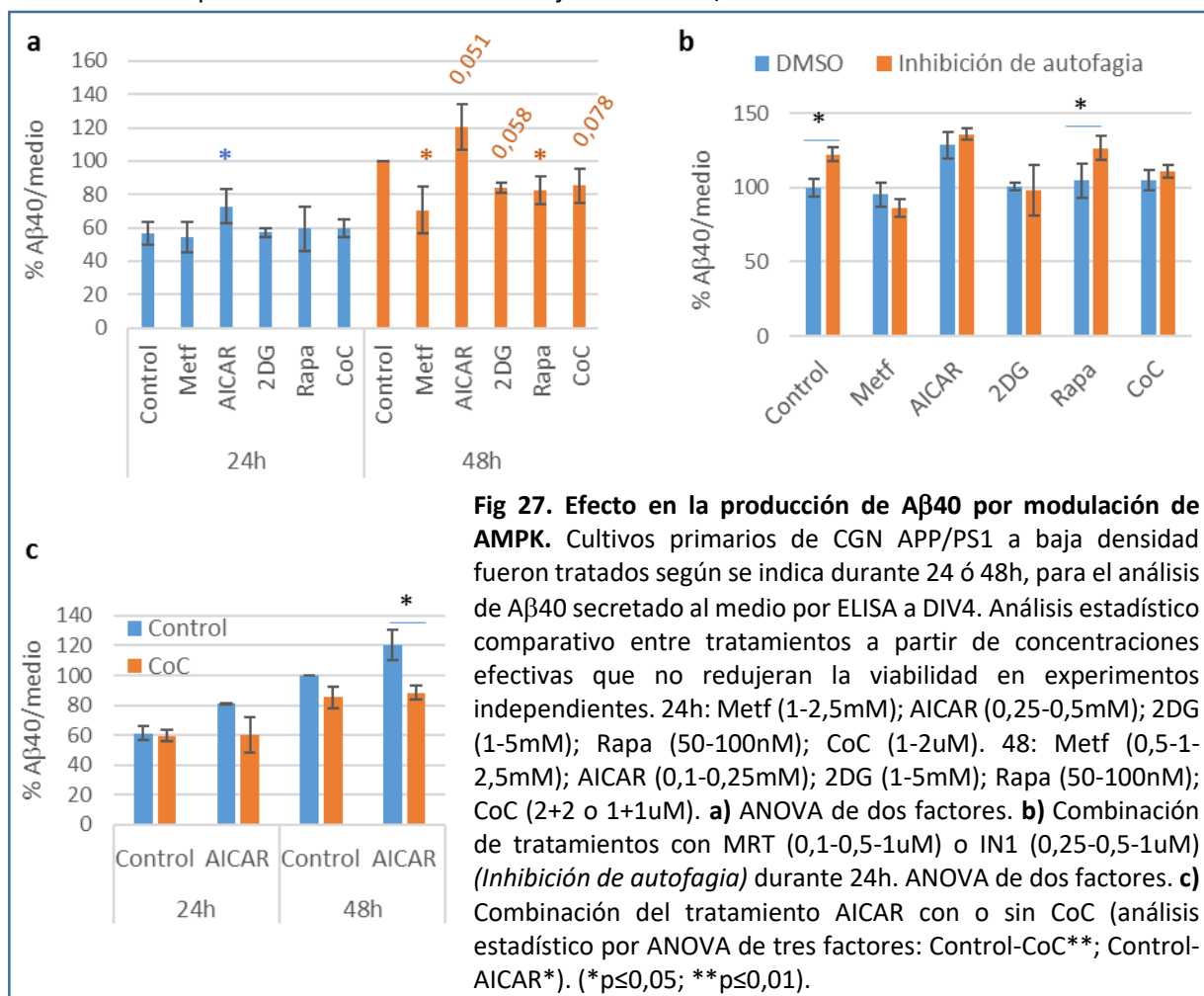
Tanto en SH-SY5Y como en CGN, la inhibición de AMPK por CoC presentaba un efecto inhibitorio en el flujo autofágico. A pesar de las diferencias observadas entre los sistemas neuronales, los resultados confirman que este efecto no correlacionaba con el estado de activación de mTORC1/P70S6K.

3.4.Efecto de la modulación de AMPK en la producción de A β 40 por CGN APP/PS1.

A pesar de la disminución del flujo autofágico observada con los activadores de la AMPK, nos llamó la atención que su inhibición con CoC también generara un bloqueo en el sistema, más acorde al papel regulador de AMPK descrito en autofagia. Por ello, quisimos comprobar si la modulación de AMPK podría tener efecto sobre la secreción del péptido amiloide. Empleamos AICAR, Metf y 2DG como activadores de AMPK y CoC como inhibidor.

Realizamos cultivos primarios de CGN procedentes de ratones APP/PS1 a baja densidad y, tras los tratamientos de 24h o 48h, recogimos el medio extracelular para cuantificar su contenido en A β 40 por ELISA (Fig 27a). Como ocurría con Rapamicina, no observamos diferencias tras 24h de tratamiento, a excepción de un aumento de los niveles de A β 40 en presencia de AICAR. No obstante, tras 48h de tratamiento observamos una reducción significativa de beta-amiloide con Metformina, así como una tendencia con 2DG ($p = 0,058$). Por el contrario, AICAR presentaba una tendencia de aumento de A β 40 tras 48h de tratamiento ($p = 0,051$), similar a la de 24h. Tampoco apreciamos diferencias significativas en el caso de CoC respecto al control ($p = 0,078$) (Fig 27a).

Con el fin de comprobar si las variaciones de los niveles de A β 40 por los moduladores de AMPK están relacionadas con la afectación de la autofagia, realizamos un experimento análogo utilizando los inhibidores de la formación de autofagosomas MRT68921 y VPS34-IN1. No obstante, la combinación de estos compuestos con los moduladores de AMPK generó una toxicidad celular alta a 48h de tratamiento (Datos no mostrados). Por ello, limitamos el análisis de los niveles de A β 40 extracelulares a 24h de tratamiento combinado, cuando aún no presentaban una toxicidad apreciable (Fig 27b). Como vimos anteriormente, los inhibidores de formación de autofagosomas IN1 y MRT generaron un aumento significativo de los niveles de amiloide tanto en presencia de Rapamicina como en condiciones de autofagia basal (control). Sin embargo, no apreciamos diferencias en ningún modulador de AMPK al compararlo con el tratamiento conjunto con IN1/MRT.



Puesto que Metformina y 2DG generaron una disminución de A β 40 y AICAR un aumento (Fig 27a), tratamos de discernir si alguno de estos efectos estaba mediado por AMPK al revertir su activación con CoC. Aunque por western blot observamos que CoC revertía efectivamente la activación de AMPK por 2DG, Metf o AICAR (Fig 25), sólo observamos una reversión del efecto en la secreción de A β en el caso de AICAR (Fig 27c).

La falta de efecto de MRT/IN1 sobre la secreción de A β 40 por los moduladores de AMPK podría deberse a un efecto redundante en la disminución del flujo autofágico, observada con todos los compuestos. No obstante, Metformina y 2DG generaron una disminución de A β 40 y AICAR un aumento (Fig 27a), mientras que CoC sólo revirtió el efecto en la secreción de A β por AICAR (Fig 27c). Este efecto contrapuesto entre los activadores de AMPK permite descartar una relación directa entre la actividad

de AMPK sobre autofagia y la secreción de beta-amiloide. Por tanto, algunos de estos compuestos moduladores de AMPK podrían repercutir en la amiloidogénesis por mecanismos independientes de autofagia.

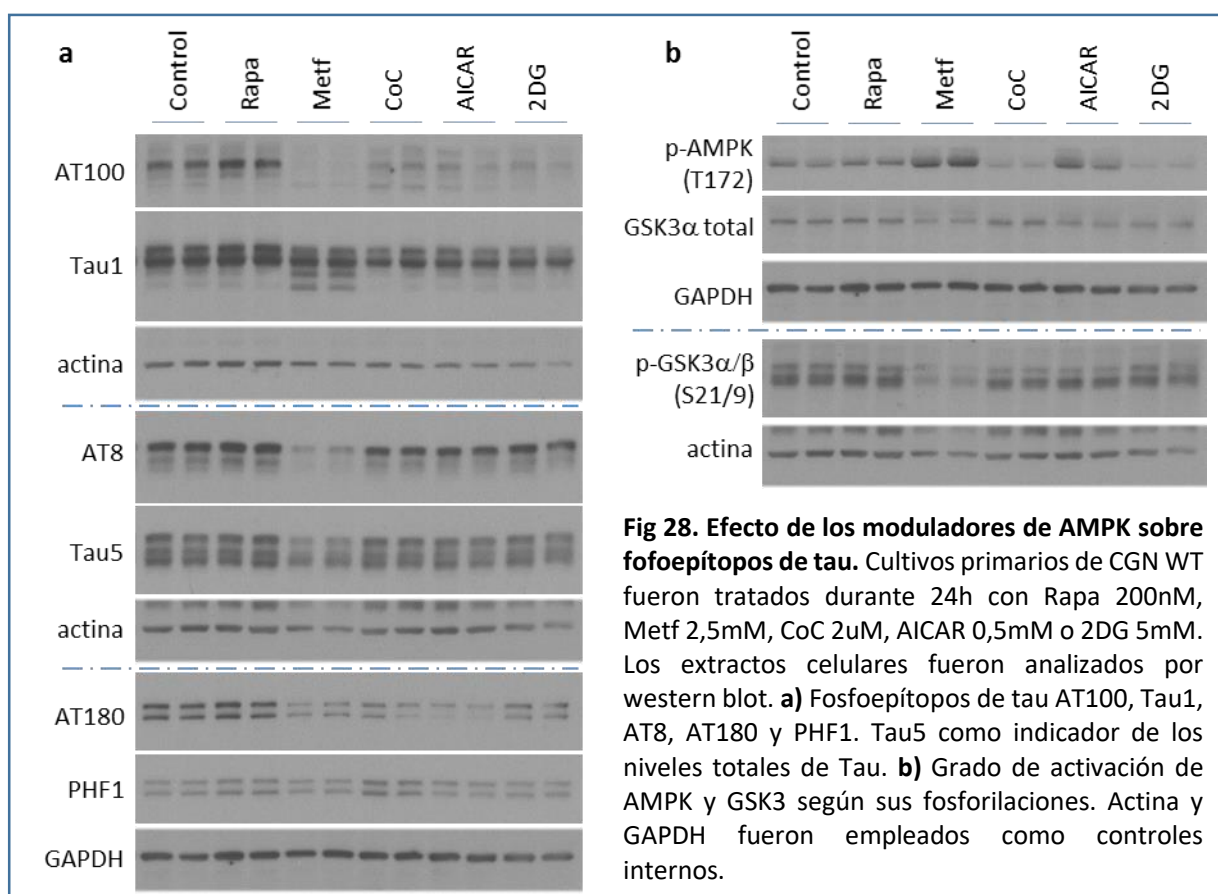
3.5. Efectos celulares de los moduladores de AMPK independientes de autofagia.

Quisimos averiguar qué otros procesos celulares podrían estar modificando Metformina y AICAR de manera independiente a AMPK y autofagia, para tener dichos efectos contrapuestos en la secreción de beta-amiloide.

Debido a las diferencias entre cultivos de SH-SY5Y y de neuronas primarias, especialmente relacionadas con los efectos celulares de la modulación de la ruta AMPK, decidimos realizar este estudio directamente en cultivos de CGN. Además, examinamos marcadores propios de neuronas polarizadas como tau, aparte de otras proteínas indicadoras de mecanismos proteostáticos, rutas de señalización y procesos patológicos (datos no mostrados).

3.5.1. Metformina y AICAR disminuyen diferentes fosforilaciones de Tau.

Se ha descrito una gran implicación de los compuestos activadores de AMPK en la regulación de la proteína tau, implicada en la patología de Alzheimer (Salminen et al., 2011), ya sea de manera AMPK-dependiente (Kim et al., 2015) o independiente (Kickstein et al., 2010; Wang et al., 2015). Por tanto, decidimos analizar los efectos de los mismos en nuestros cultivos primarios de CGN.



Realizamos cultivos de CGN a partir de ratones WT, hermanos de camada de los APP/PS1. Los tratamos durante 24h con Metf 2,5mM y AICAR 0,5mM, y los comparamos con los otros moduladores CoC 2uM y 2DG 5mM, así como con Rapa 200nM (Fig 28). Observamos por western blot que la Metformina generaba una ligera bajada de los niveles totales de tau (Tau5), aunque la defosforilación de determinados epítomos fue mucho más acusada (AT100, Tau1, AT8, AT180 y en menor medida PHF1) (Fig 28a). Metformina también generó un incremento del marcaje con Tau1 en dos bandas de menor peso molecular. Algunos de estos fosfoepítomos también mostraron variaciones más moderadas con los otros moduladores de AMPK (CoC, AICAR y 2DG), a diferencia del inhibidor de mTORC1 Rapamicina que no los modificó apreciablemente (Fig 28a).

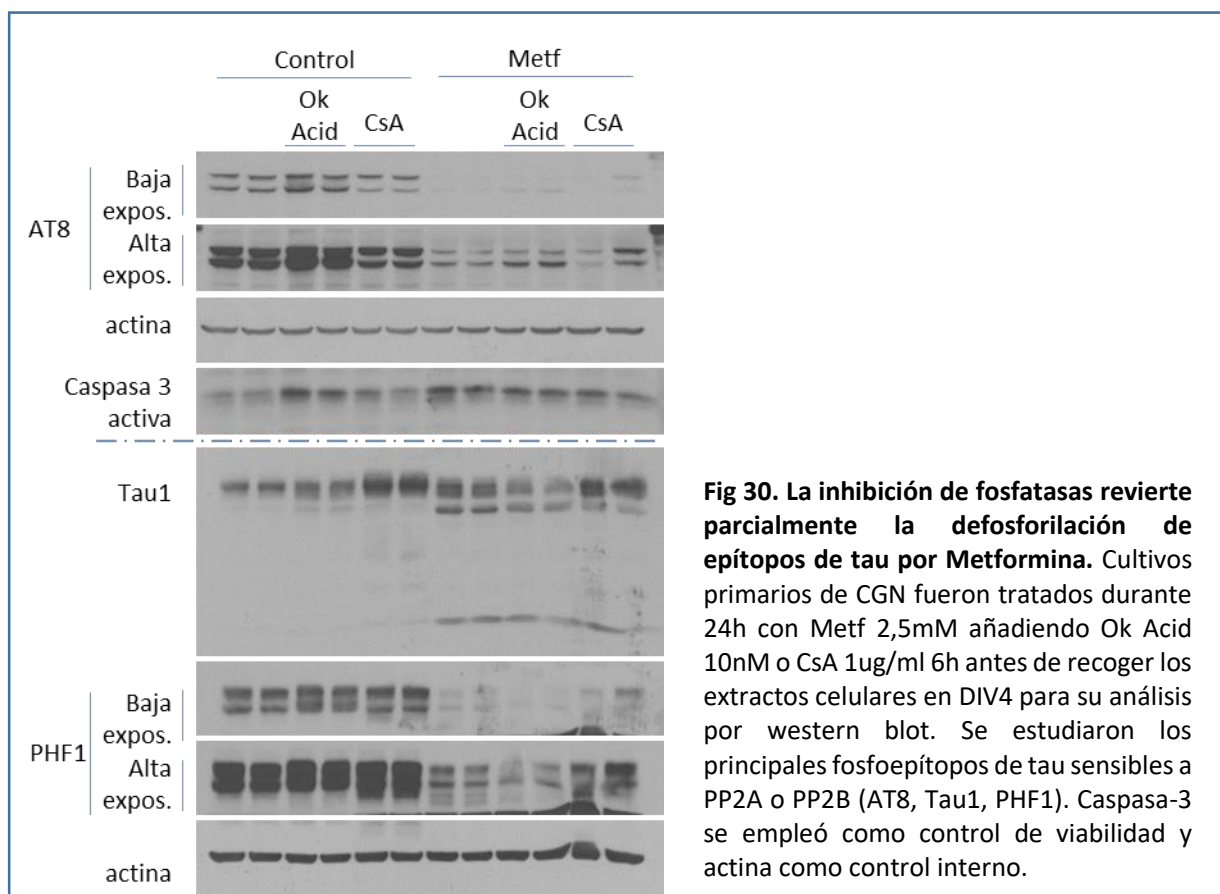
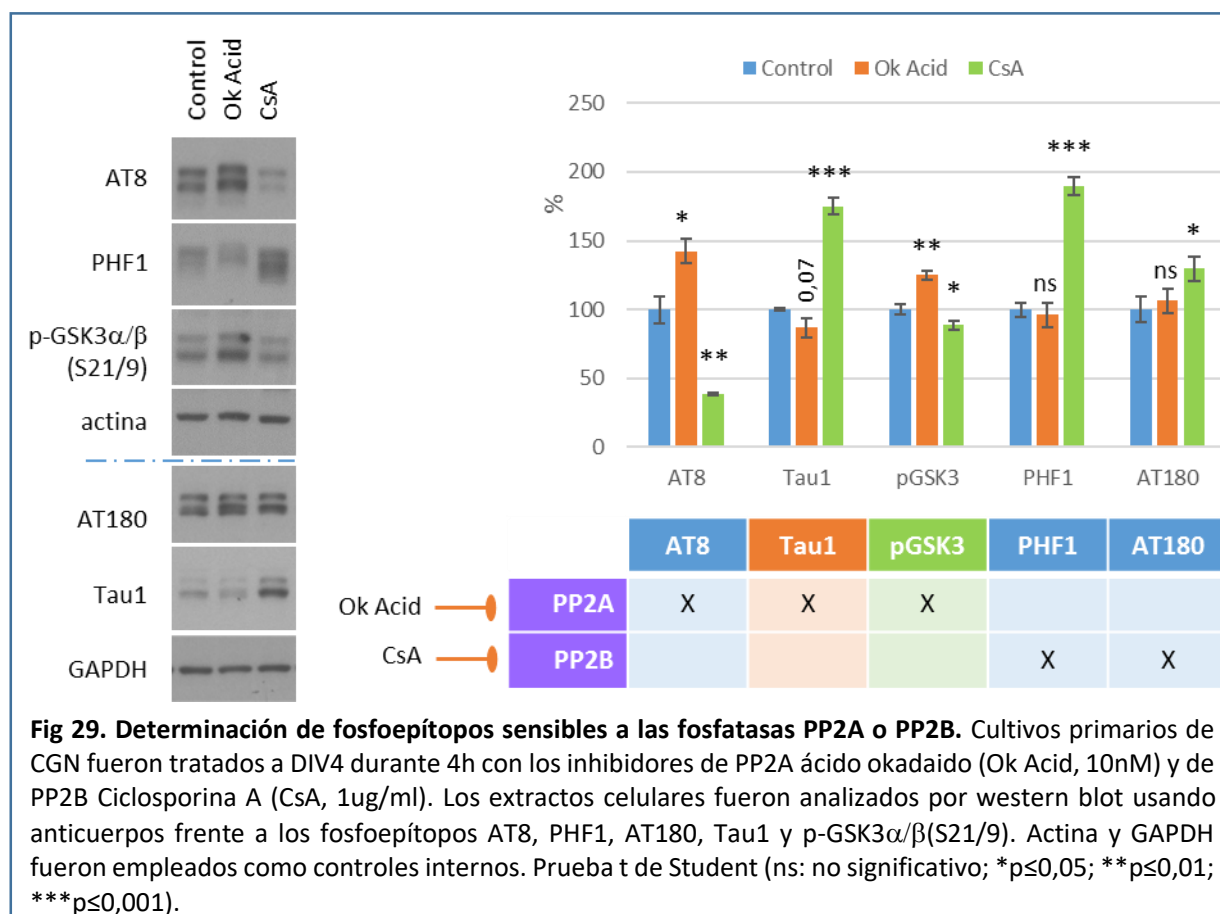
Analizamos los niveles de actividad de GSK3, ya que es la principal quinasa descrita para la hiperfosforilación de tau (Maqbool et al., 2016), y podría verse inhibida por la fosforilación de AMPK (Greco et al., 2009). Sin embargo, los niveles de pGSK3 (S21/9) también se vieron reducidos con Metformina, y por lo tanto su actividad aumentada (Fig 28b).

3.5.2. La inhibición de fosfatasas revierte parcialmente la defosforilación de epítomos de tau por Metformina.

Los niveles de fosforilación de tau no sólo no correlacionaban con la actividad de las quinasas AMPK o GSK3 alfa/beta, sino que además disminuían considerablemente en presencia de Metformina. No obstante, se ha descrito que GSK3 es activada por la acción de la fosfatasa PP2A (Wang et al., 2015) y que ésta a su vez puede ser inducida por Metformina de manera independiente de AMPK (Kickstein et al., 2010).

Para determinar la implicación de las principales fosfatasas en la defosforilación de tau, tratamos de revertir su efecto empleando los inhibidores de la PP2A Ácido Okadaico (Ok Acid) y de la PP2B Ciclosporina A (CsA) en CGN. Tras 4h de tratamiento, la inhibición de PP2A con Ácido Okadaico se manifestaba con un aumento en los niveles de fosforilación de los epítomos detectados por AT8, así como de la fosforilación de p-GSK3 α/β (S21/9) (Fig29). La inhibición de PP2B con CsA se reflejó en un aumento de la fosforilación de PHF1 y AT180.

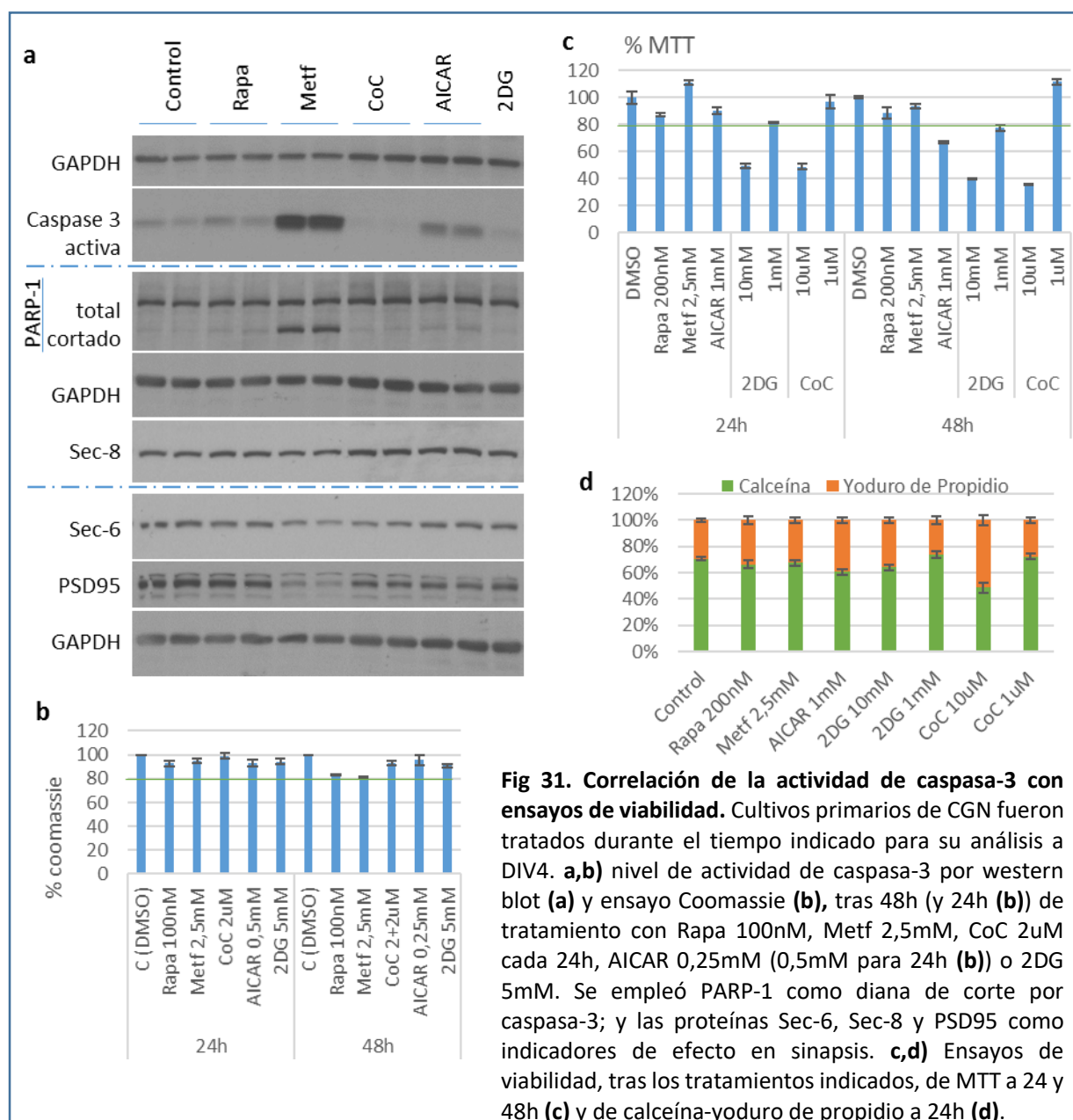
Sin embargo, a 4h de tratamiento no observamos modificaciones significativas de los marcadores de fosfo-tau por Metformina o AICAR, y a tiempos largos el tratamiento con Ácido Okadaico era tóxico (datos no mostrados). Consecuentemente, tratamos de hacer una reversión de las variaciones de los fosfoepítomos de tau tras 24h de tratamiento con Metformina, añadiendo los inhibidores de las fosfatasas durante las últimas 6h (Fig 30). Con el inhibidor de PP2A, Ok Acid, conseguimos apreciar cierta recuperación de la fosforilación de AT8 y tau1 en presencia de Metformina. Análogamente, con el inhibidor de PP2B, CsA, pudimos apreciar una cierta recuperación de la fosforilación de PHF1. Todo ello apoyaba la hipótesis de una relevante implicación de las fosfatasas PP2A y PP2B en el efecto particular de la Metformina en neuronas.



3.5.3. Metformina y AICAR generan una activación de caspasa-3 no apoptótica.

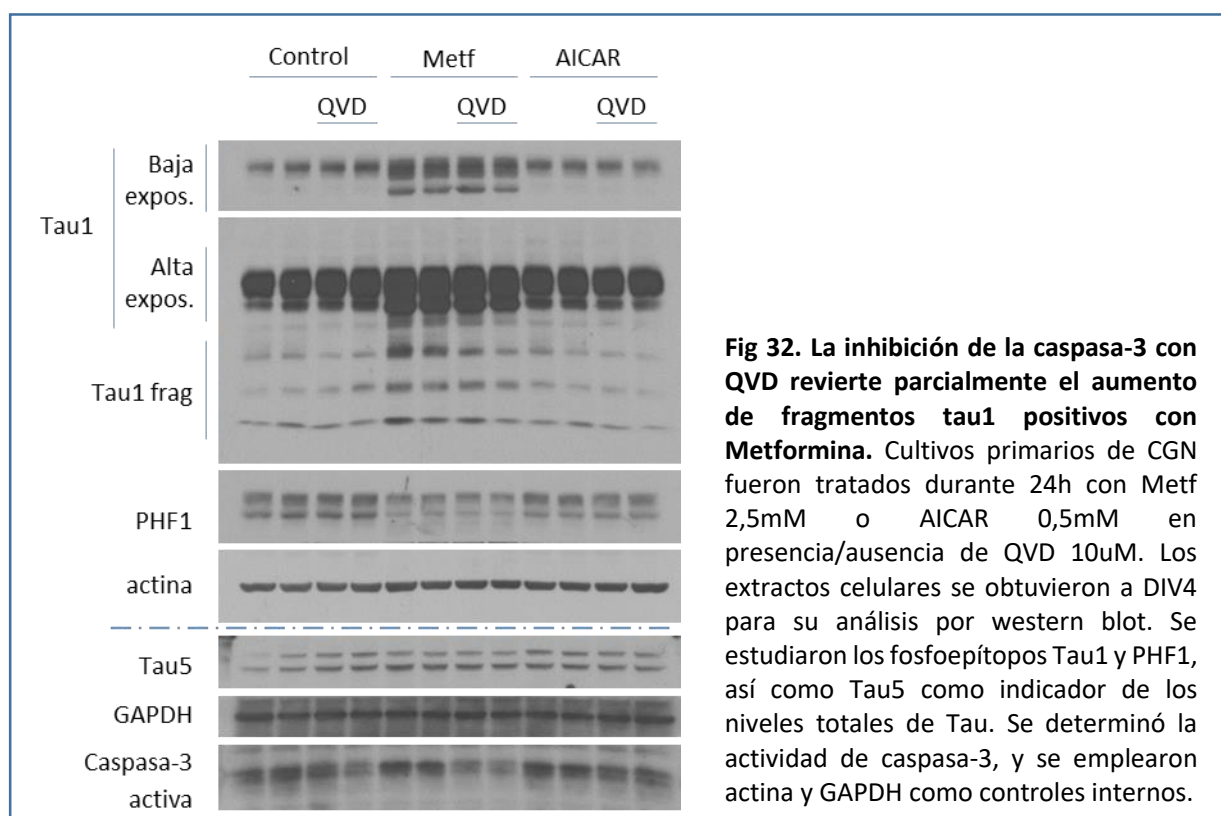
Si bien los inhibidores de fosfatasa no revirtieron el bandeo observado en tau1 con Metformina, nos llamó la atención la aparición de un patrón similar tras 24h de tratamiento con Ácido Okadaico (Dato no mostrado). Esto nos hizo pensar en la inducción de una mayor actividad proteasa por Metformina, además de la acción de las fosfatasa.

Realizamos cultivos de CGN con tratamientos a 24h o 48h, y analizamos el fraccionamiento de PARP-1 y la activación de caspasas. Como se puede apreciar por western blot, Metformina, y en menor proporción AICAR, inducían la proteólisis activadora de caspasa-3 y la fragmentación de una de sus dianas, PARP-1 (Fig 31a). En paralelo, realizamos un marcaje proteico con Coomassie a 24h y 48h, pudiendo comprobar que la Metformina no reducía significativamente la masa celular en esas condiciones (Fig 31b). Además, los ensayos de viabilidad realizados previamente confirmaban la inocuidad de la Metformina en esas condiciones tanto por MTT (Fig 31c) como por calceína-yoduro de



propidio (Fig 31d). Acorde a una función no apoptótica, se ha descrito que la caspasa-3 participa en procesos locales en neuronas como remodelación del citoesqueleto (Day et al., 2015) o la plasticidad sináptica (D'Amelio et al., 2010; Wang and Luo, 2014). Conforme a esto, observamos una disminución significativa de marcadores sinápticos con Metformina como PSD95 o las proteínas implicadas en tráfico de endomembranas Sec-6 o Sec-8 (Fig 31a).

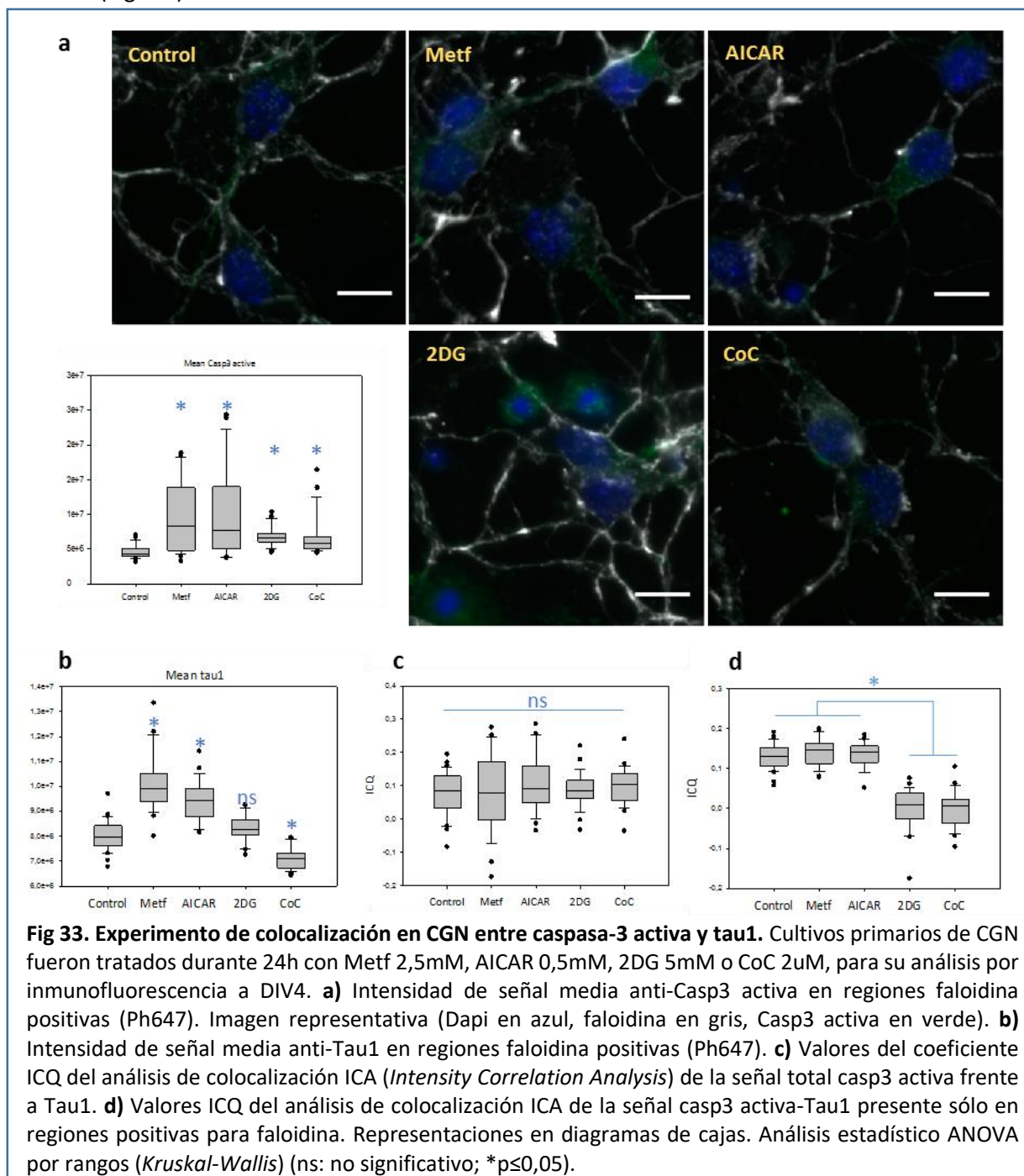
Nos planteamos entonces si la caspasa-3 podría estar participando en una proteólisis de tau por Metformina, generando los fragmentos tau1-positivos. Tratamos las neuronas con Metformina durante 24h y empleamos QVD para prevenir la activación de la caspasa-3 (Fig 32). Por western blot pudimos observar que los fragmentos de bajo peso molecular-tau1 positivos (Tau1 frag) con Metformina se reducían en presencia de QVD. Este resultado apoya que la fragmentación de tau defosforilado se produce a través de la activación de la caspasa-3 por Metformina.



Realizamos un experimento de localización celular para confirmar la distribución de la caspasa-3 activa en CGNs no apoptóticas, así como su relación espacial con el marcaje tau1-positivo. Cuantificamos la intensidad de la caspasa-3 activa sólo en regiones positivas para F-actina, según el marcaje con faloidina fluorescente, que delimitaba la morfología neuronal y así excluir restos apoptóticos del análisis (Fig 33). Observamos que la intensidad media de caspasa-3 activa (Fig 33a) y de tau1 (Fig 33b) en neuronas era significativamente mayor con los activadores de AMPK Metformina y AICAR que en el resto de condiciones.

Para comprobar si existía una relación física entre ambos marcajes, realizamos una colocalización cuantitativa con el plugin ICA (*Intensity Correlation Analysis*) del programa ImageJ, según se detalla en materiales y métodos. Observamos que tau1 y caspasa-3 activa presentaban una relación de dependencia ($0 < ICQ < +0,5$), la cual no cambió significativamente entre los tratamientos (Fig33b).

Delimitamos el estudio de colocación tau1-caspasa3 activa a las regiones positivas para faloidina, excluyendo así el efecto derivado de restos apoptóticos (Fig 33c). Análogamente, el coeficiente ICQ nos indicó que la dependencia entre tau1 y caspasa-3 activa no variaba en los tratamientos de Metformina y AICAR respecto al control. Sin embargo, los valores de ICQ para 2DG y CoC eran significativamente menores y en torno a cero indicando una pérdida de relación entre las señales (Fig 33c).



De esta manera concluimos que existe una relación de dependencia entre la actividad de la caspasa3 y la señal tau1 positiva, que se mantiene al aumentar su intensidad sin generar toxicidad con los activadores de AMPK, Metf y AICAR. No obstante, esta relación en células vivas se pierde cuando el aumento de intensidad conlleva una muerte celular por apoptosis, como es el caso de 2DG, de manera similar a la menor colocación derivada de la disminución de la señal tau1-positiva con CoC.

3.6. Conclusiones

- Una mayor activación de la AMPK (por 2DG, Metformina o AICAR) en sistemas neuronales no sólo no aumenta el flujo autofágico, sino que parece disminuirlo.
- La actividad basal de AMPK es necesaria para la iniciación de la autofagia en sistemas neuronales independientemente de mTORC1, según su inhibición con CoC.
- Los activadores de AMPK, Metformina y AICAR generan respectivamente una disminución y un aumento de los niveles de A β 40 secretados por CGN.
- Nuestros datos sugieren que la modificación de los niveles de A β 40 por los moduladores de AMPK testados (Metformina, AICAR, 2DG y CoC) se produce de manera independiente a la autofagia, y a AMPK en el caso de Metformina.
- Un análisis preliminar destaca efectos particulares de cada compuesto sobre procesos neuronales de regulación del citoesqueleto:
 - Los moduladores de AMPK ensayados alteran los niveles de fosforilación de epítomos sensibles a fosfatasas, siendo particularmente significativo el efecto de Metformina en la defosforilación de epítomos de tau sensibles a PP2A (AT8, Tau1) y, junto con AICAR, PP2B (PHF1).
 - Metformina, y en menor medida AICAR, generan una activación no apoptótica de caspasa-3, provocando una fragmentación de tau.

4. Efecto de la Trehalosa en la amiloidosis neuronal.

Hemos visto que la modulación de la autofagia en neuronas a través de las vías descritas dependientes de mTORC1 y/o AMPK no eran muy eficientes y/o presentaban ciertos niveles de toxicidad. Por ello buscamos inductores de autofagia independientes de estas vías que fueran especialmente inocuos para las células. En este sentido, en los últimos años se ha descrito el disacárido Trehalosa como un potente inductor de autofagia independiente de mTORC1, con potencial terapéutico en determinadas proteinopatías. Por ello nos interesó estudiar su efecto en neuronas e *in vivo* en nuestro modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

4.1. Administración de Trehalosa a ratones APP/PS1.

Quisimos estudiar si la Trehalosa podría tener un efecto terapéutico en la patología de Alzheimer. Para ello realizamos un ensayo *in vivo* mediante la administración de Trehalosa al 2% en el agua de bebida, o Sacarosa al 2% como control, a ratones hembra adultas de nuestro modelo APP/PS1, tal y como describimos en Materiales y Métodos. Previo al inicio del ensayo, tomamos una muestra de plasma sanguíneo para realizar un ELISA de los niveles de A β 40 y así distribuir las ratonas en dos grupos homogéneos.

Tras dos meses de tratamiento, se sacrificaron y se aislaron muestras de plasma y tejido cerebral para su análisis. Realizamos un ELISA específico de A β 40 y de A β 42 para determinar posibles variaciones entre tratamientos (Fig 34). Al examinar los niveles tanto de A β 40 como de A β 42 en sangre, pudimos apreciar un discreto aumento no significativo en los animales tratados con Trehalosa respecto al control (Fig 34a). Por el contrario, el análisis de un fragmento de corteza prefrontal mostró una cierta bajada de A β 40 en los ratones tratados con Trehalosa en comparación con el control (Fig 34b). No se observaron diferencias al analizar los niveles de A β 42 en corteza.

Además, con las muestras obtenidas a partir de extractos de corteza cerebral de los mismos ratones, realizamos western blots para la inmunodetección del péptido amiloide total con el anticuerpo 6E10 (Fig 34c). A diferencia del ELISA, la cuantificación de A β monomérico total por western blot no mostró una disminución en el grupo tratado con Trehalosa, aunque tampoco se obtuvieron diferencias significativas. El análisis de los fragmentos CTF, generados por la acción de las alfa o beta-secretasas, tampoco pareció indicar diferencias significativas en el procesamiento de APP (Fig 34c).

La conclusión inicial podría ser que Trehalosa no tiene efecto en este modelo. No obstante, la falta de una diana molecular descrita para este compuesto nos impidió discernir si la Trehalosa era o no capaz de atravesar la barrera hematoencefálica a una concentración relevante, o si se trataba de condiciones insuficientes de dosis o periodo de tiempo. Por ello, para poder estudiar los mecanismos de acción de la Trehalosa en neuronas, decidimos ahondar en los efectos moleculares empleando nuestros modelos neuronales en cultivo.

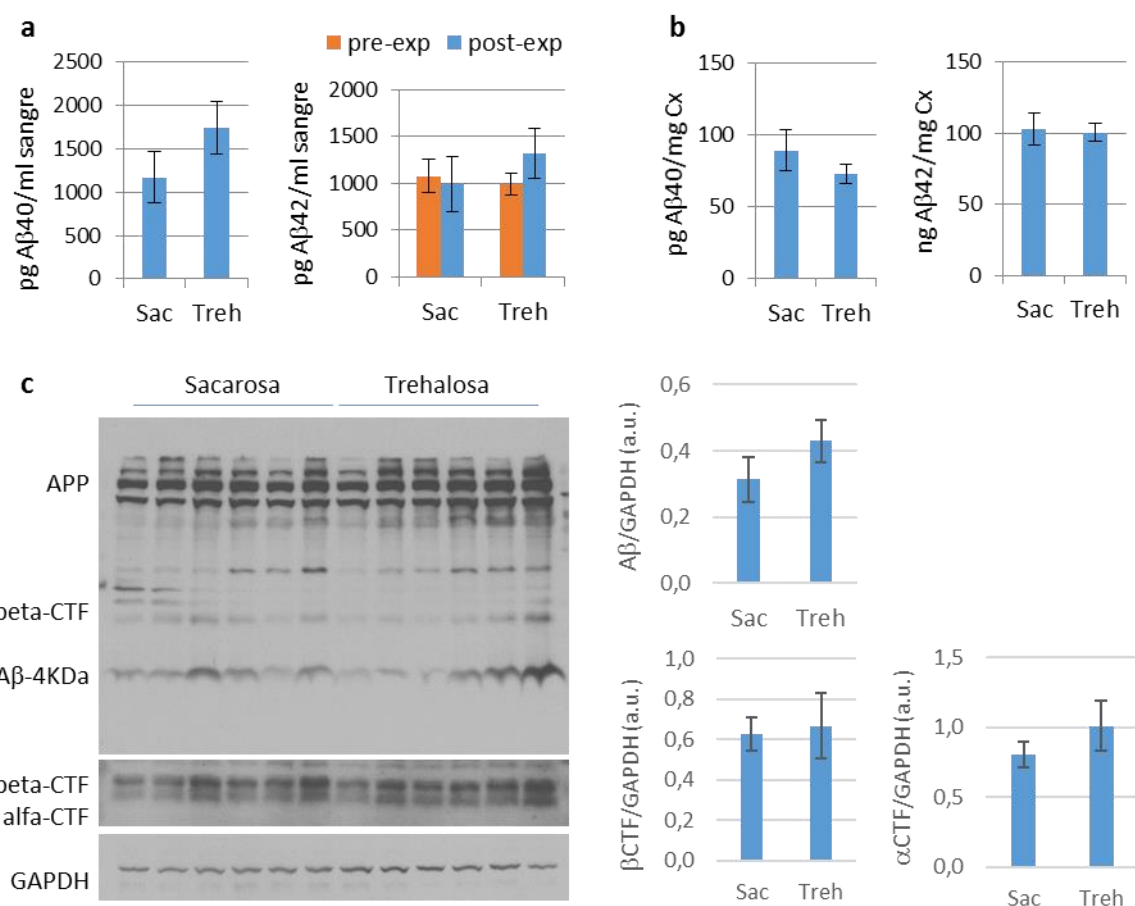
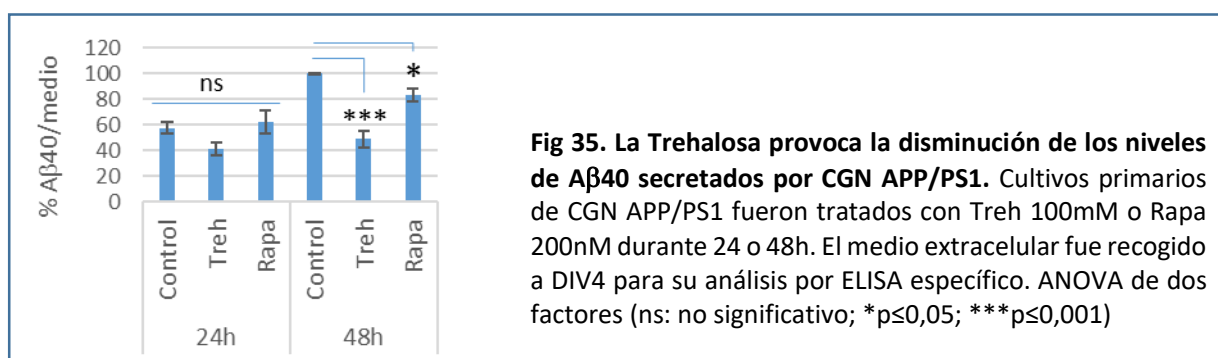


Fig 34. Análisis del procesamiento amiloide en ratones tratados con Trehalosa o Sacarosa. Ratones hembra adultas fueron tratadas durante dos meses con Trehalosa o Sacarosa 2% en el agua de bebida *ad libitum*. **a,b)** Niveles de Aβ40/42 por ELISA específico detectados en plasma sanguíneo recogido al inicio y al final del experimento (**a**) y en corteza prefrontal (al final del experimento) (**b**). **c)** Western blot de extractos de corteza para el análisis de fragmentos amiloides Aβ y beta-CTF por inmunomarcaje con 6E10; y alfa-CTF con anti-APP C-terminal. GAPDH de empleó como control interno. Los datos fueron cuantificados y normalizados con respecto a GAPDH.

4.2. La Trehalosa disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGN.

Nos preguntamos si la administración directa de Trehalosa a las neuronas podría tener alguna repercusión en la secreción de beta-amiloide y, en este caso, si lo hacía mediante la descrita inducción de autofagia.

Realizamos cultivos primarios de CGN a partir de ratones P5-P7 transgénicos APP/PS1 y, tras los tratamientos, recolectamos el medio para detectar los niveles de A β 40 secretado por ELISA. Tratamos durante 24h o 48h con Trehalosa 100mM y empleamos Rapamicina 200nM como control de disminución de A β 40 por autofagia (Fig 35). Los resultados cuantitativos del ELISA no mostraron diferencias estadísticamente significativas a 24h de tratamiento. Sin embargo, a 48h de tratamiento con Trehalosa los niveles de A β 40 secretados al medio habían disminuido un 50% respecto al control, mientras que el inductor de autofagia Rapamicina seguía generando una reducción del 20% aproximadamente (Fig 35).



Este resultado nos confirmó que efectivamente la Trehalosa ejerce un efecto en neuronas reduciendo la secreción de beta-amiloide. Nos preguntamos si dicha disminución estaría mediada por autofagia como en el caso de Rapamicina.

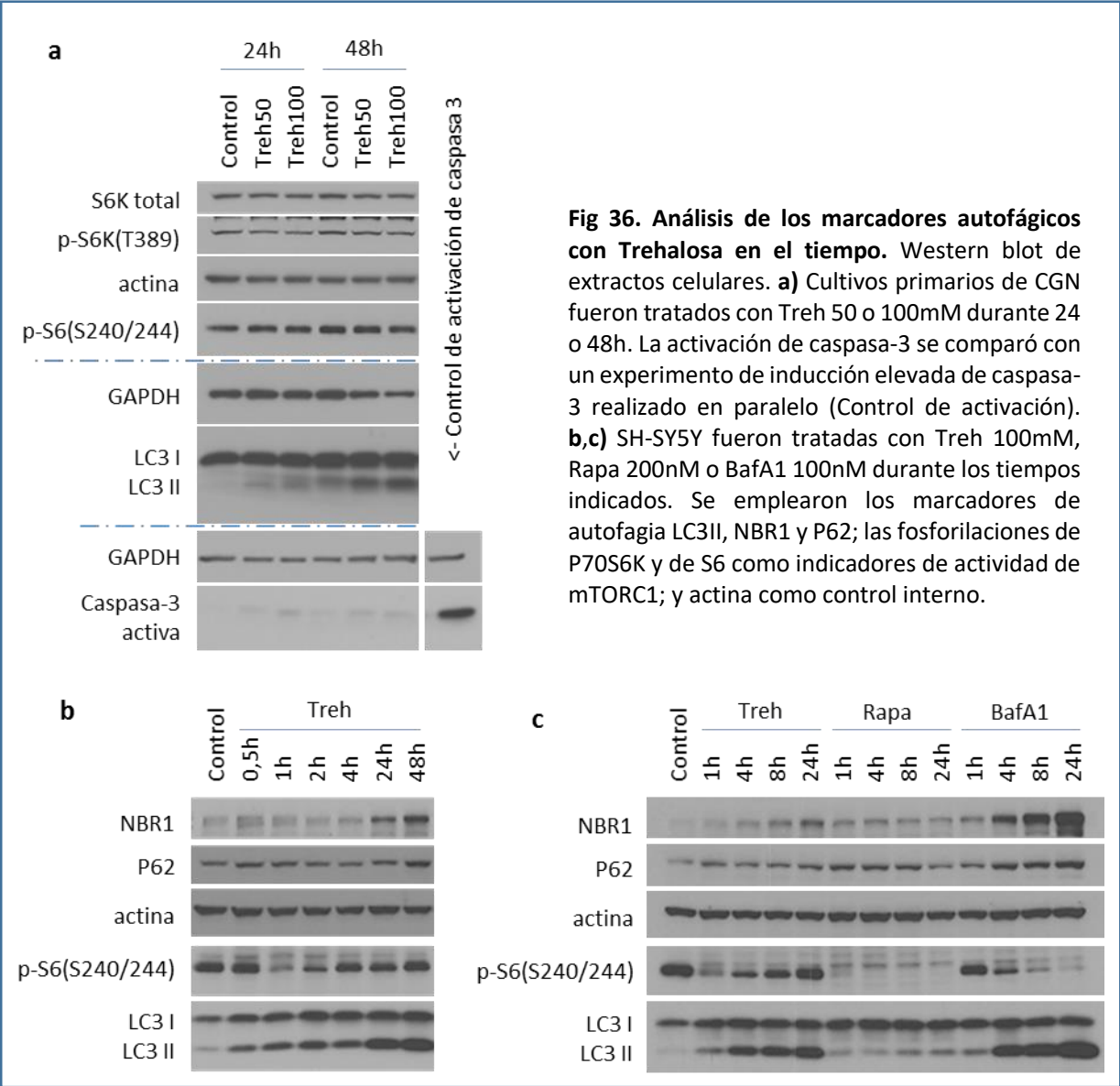
4.3. Modulación de los marcadores de autofagia en neuronas con Trehalosa en el tiempo.

Al igual que con Rapamicina, analizamos si la Trehalosa tenía algún efecto en los marcadores de autofagia por western blot. Realizamos cultivos primarios de CGN y los tratamos con concentraciones de 50mM y 100mM Trehalosa durante 24h y 48h (Fig 36a). Como control, comprobamos que no generaba activación de caspasa 3. Asimismo, no detectamos cambios significativos en la actividad de mTORC1 al mirar el nivel de fosforilación de su diana P70S6K o de S6. Sin embargo, pudimos comprobar que los niveles de LC3II, y por lo tanto de AVs, aumentaban considerablemente con la concentración tanto a 24h como a 48h de tratamiento con Trehalosa (Fig 36a).

Puesto que Trehalosa generaba una drástica modificación de los marcadores autofágicos, procedimos a realizar un estudio más exhaustivo de su posible efecto en la autofagia por western blot usando el linaje neuronal SH-SY5Y. En estas células, administramos 100mM Trehalosa y observamos de nuevo el aumento de los niveles de LC3II con el tiempo de tratamiento (Fig 36b). Curiosamente, los niveles de los adaptadores autofágicos NBR1 y P62 aumentaron a 24h y más notablemente a 48h, a diferencia de la disminución observada previamente con Rapamicina. Además, según los niveles de

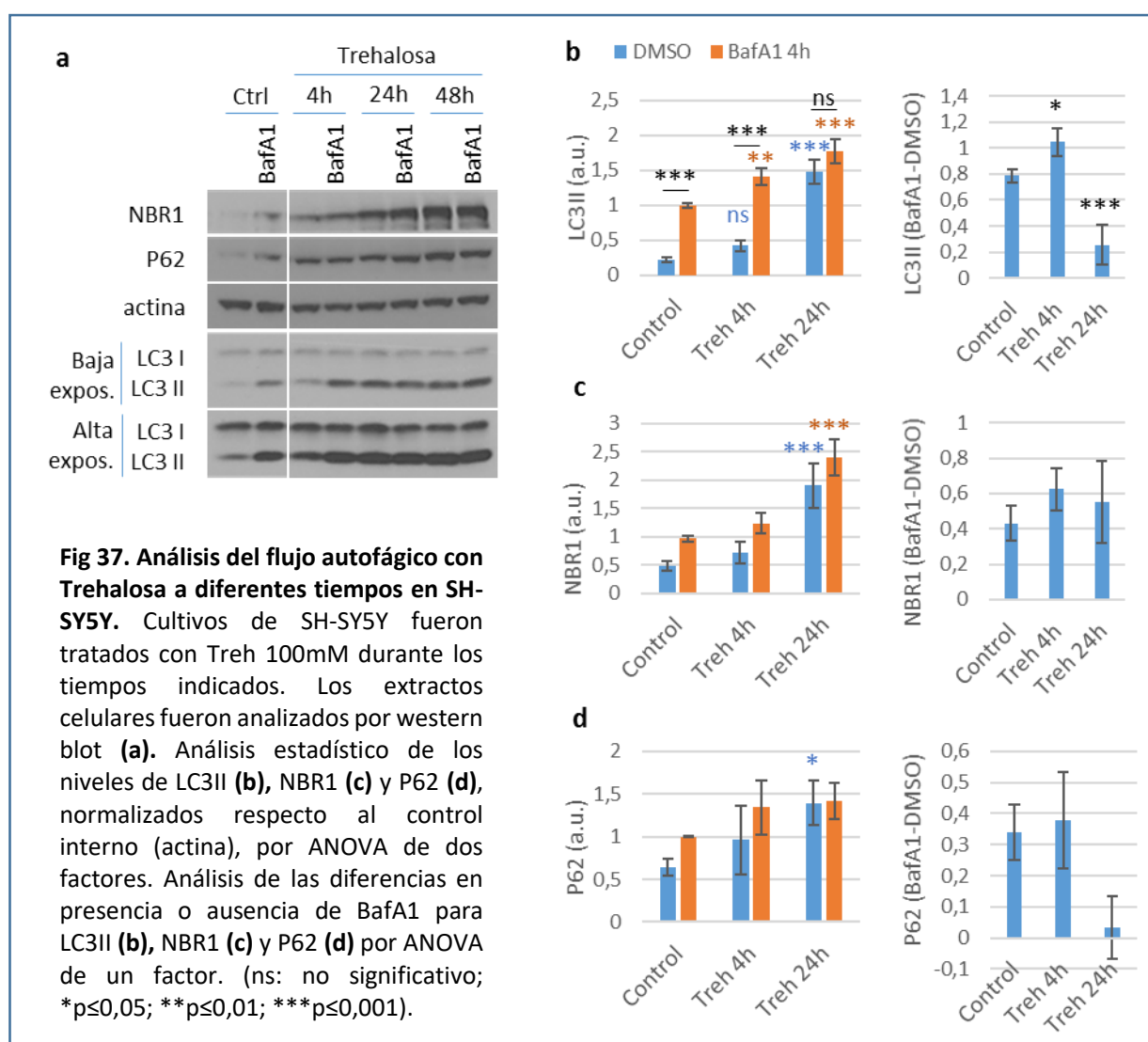
fosforilación de p-S6(S240/244), Trehalosa generaba una inhibición de la vía mTORC1/P70S6K temprana, detectada tras una hora de tratamiento, pero que se recuperaba rápidamente a partir de la segunda hora (Fig 36b).

Comparamos la dinámica de acumulación de los marcadores autofágicos de Trehalosa con la del inductor de autofagia Rapamicina y el inhibidor de degradación Bafilomicina (Fig 36c). Como ya hemos descrito, con Rapamicina los niveles de LC3II aumentaban sutilmente en el tiempo, mientras que la acumulación en presencia de Trehalosa, aunque menos acusada, recuerda al incremento drástico con Bafilomicina. Además, Rapamicina disminuía los niveles de NBR1 y P62, mientras que Trehalosa los aumentaba ligeramente, aunque en mucha menor proporción que con Bafilomicina. Además, nos llamó la atención el efecto sobre la vía mTORC1/P70S6K, según p-S6(S240/244), aparentemente opuesto entre Trehalosa y Bafilomicina. Si bien con Bafilomicina la actividad de la vía era menor con el tiempo, en el caso de Trehalosa se recuperaba tras un pico de inhibición a la hora de tratamiento (Fig36c).

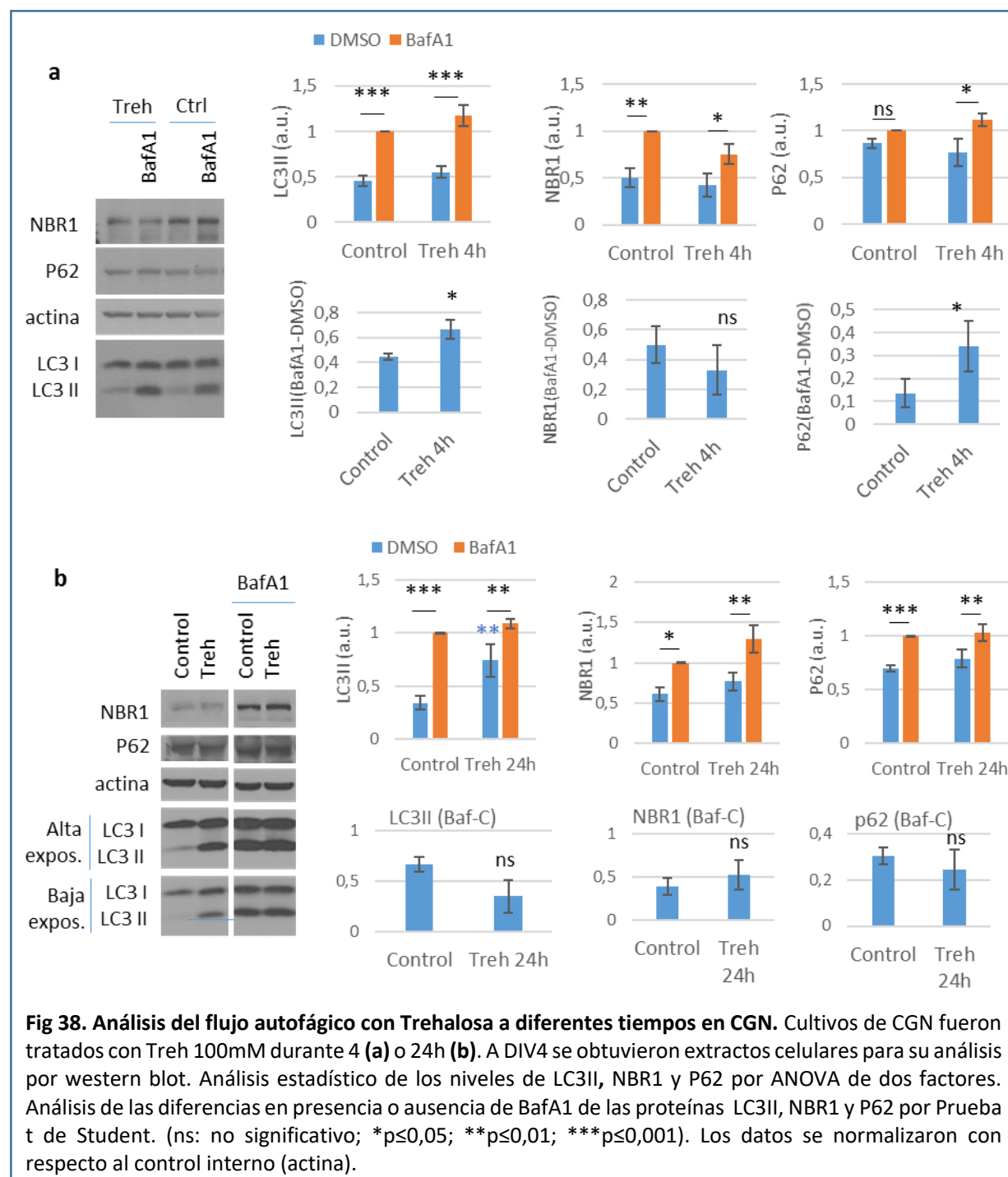


4.3.1. Trehalosa aumenta el flujo autofágico a corto plazo.

El aumento sutil de los marcadores autofágicos con Trehalosa podría deberse a una inhibición de la degradación lisosomal o bien a una excesiva formación de vesículas autofágicas. Para poder distinguir entre ambas opciones, realizamos ensayos de flujo autofágico en SH-SY5Y tanto a 4h como a 24h de tratamiento, debido al diferente grado actividad de la vía mTORC1/P70S6K en el tiempo (Fig 37). Cuantificando los niveles de LC3II, observamos que la Trehalosa era capaz de incrementar el flujo autofágico tras 4h de tratamiento, ya que no sólo aumentaba la presencia de AVs, sino que además la acumulación con Bafilomicina era mayor que en situación control (Fig 37a, b). Por el contrario, tras 24h en presencia de Trehalosa los niveles de LC3II eran mucho mayores, pero el flujo autofágico parecía estar afectado ya que la adición de BafA1 no generaba un incremento comparativo estadísticamente significativo (Fig 37a, b). Al analizar los niveles de los adaptadores autofágicos NBR1 y p62, pudimos observar una tendencia similar a la obtenida con LC3II no estadísticamente significativa (Fig 37a, c, d). Ambos resultados sostienen que la capacidad de la Trehalosa para inducir autofagia disminuye a tiempos largos de tratamiento.



Para comprobar si este aparente incremento inicial y posterior bloqueo de autofagia con la Trehalosa observado en la línea neuronal immortalizada se reproducía en neuronas, realizamos un experimento similar en cultivos primarios de CGN (Fig 38a,b). Análogamente, 4h de tratamiento con Trehalosa generaron un aumento del flujo autofágico, con una acumulación de LC3II y p62 mayor en presencia de Bafilomicina (Fig 38a). No se observaron diferencias significativas respecto al control en los niveles de NBR1 (Fig 38a). Asimismo, la administración de Trehalosa durante periodos más largos provocaba el aumento de LC3II sin un incremento del flujo autofágico (Fig 38b). Igualmente, ni los niveles de p62 ni de NBR1 se vieron reducidos, aunque al adicionar Bafilomicina pudimos comprobar que la eficiencia degradativa no se veía afectada a tiempos largos de tratamiento (Fig 38b).

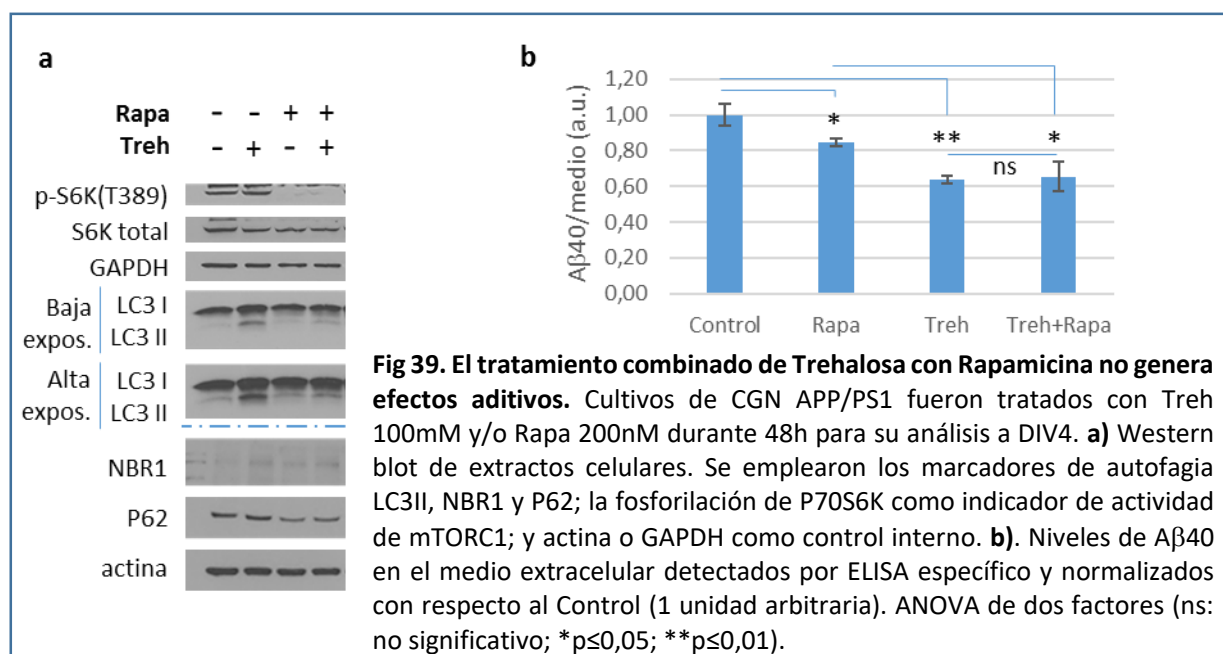


Estos resultados sugieren que la Trehalosa genera una cierta acumulación en el sistema de endomembranas/AVs a tiempos largos, sin afectar negativamente a la degradación lisosomal de origen autofágico.

4.4. Trehalosa disminuye los niveles de A β 40 secretados por CGN de manera independiente de autofagia.

Para comprobar si la importante disminución de A β 40 al tratar las neuronas con Trehalosa estaba mediada por autofagia, realizamos tratamientos conjuntos con el inductor Rapamicina o con los inhibidores MRT68921 y VPS34-IN1.

Quisimos analizar si el tratamiento de Trehalosa a tiempos largos afectaba a la degradación por autofagia de A β 40 inducida por Rapamicina. Para ello tratamos cultivos primarios de CGN durante 48h con Rapamicina y/o Trehalosa (Fig 39). Analizando los marcadores de autofagia, comprobamos que la disminución de los niveles de P62 por Rapamicina no se veía alterada con la presencia de Trehalosa (Fig 39a). Además, el incremento de los niveles de LC3II y de NBR1 por Trehalosa se vio parcialmente revertido por la presencia de Rapamicina. Estos resultados confirmaban que el tratamiento prolongado con Trehalosa no generaba un bloqueo en la degradación lisosomal mediada por autofagia basal o inducida (Fig 39a). Además, el análisis por ELISA de los niveles de A β 40 secretados al medio, tras 48h de tratamiento, no mostró ningún efecto aditivo entre ambos compuestos (Fig 39b). Estos datos sugieren que el efecto anti-amiloidogénico mediado por Trehalosa a largo plazo podría ser independiente de autofagia.



Para confirmar esta hipótesis, realizamos una aproximación complementaria usando los inhibidores del inicio de la autofagia, MRT68921 y VPS34-IN1, en combinación con Trehalosa en cultivos de CGN. Analizamos los marcadores autofágicos por western blot, y comprobamos que ambos inhibidores eran capaces de prevenir el aumento de LC3II característico de los tratamientos

prolongados con Trehalosa (Fig 40a). En un experimento paralelo, realizamos cultivos de CGN APP/PS1 a baja densidad y los tratamos durante 24h o 48h con dichos inhibidores en combinación con Trehalosa o Rapamicina como control. El análisis cuantitativo de los sobrenadantes por ELISA específico mostró un mantenimiento en el tiempo de los niveles de A β 40 con Trehalosa muy por debajo de los controles sin tratar (Fig 40b). Además, la adición de MRT o IN1 no modificó dicha reducción por Trehalosa, a diferencia del aumento ya descrito previamente en condiciones control o con Rapamicina (Fig 40b).

En conjunto, podemos concluir que la Trehalosa reduce los niveles de beta-amiloide secretado de manera independiente al estado en que se encuentre la autofagia.

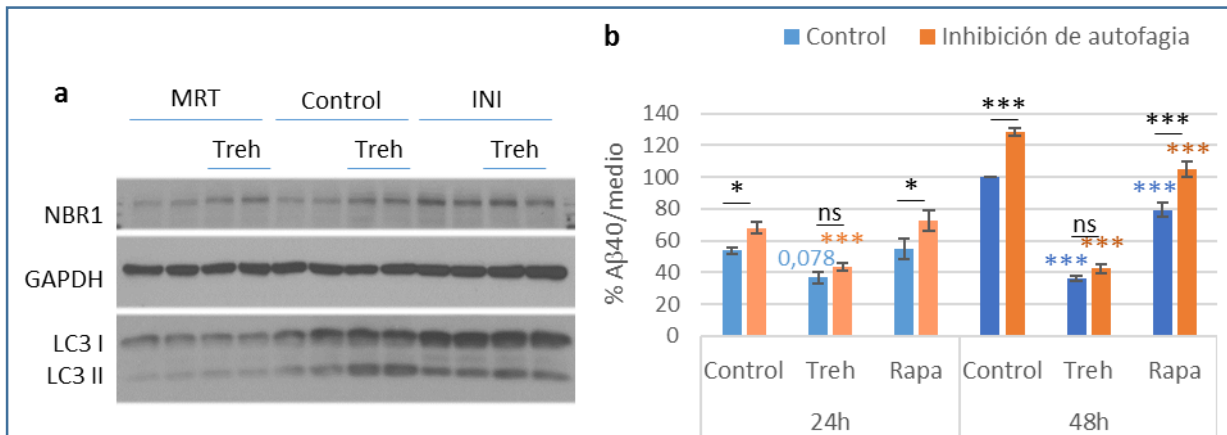


Fig 40. La prevención de autofagia por IN1 y MRT no revierte el efecto antiamiloidogénico de Trehalosa.

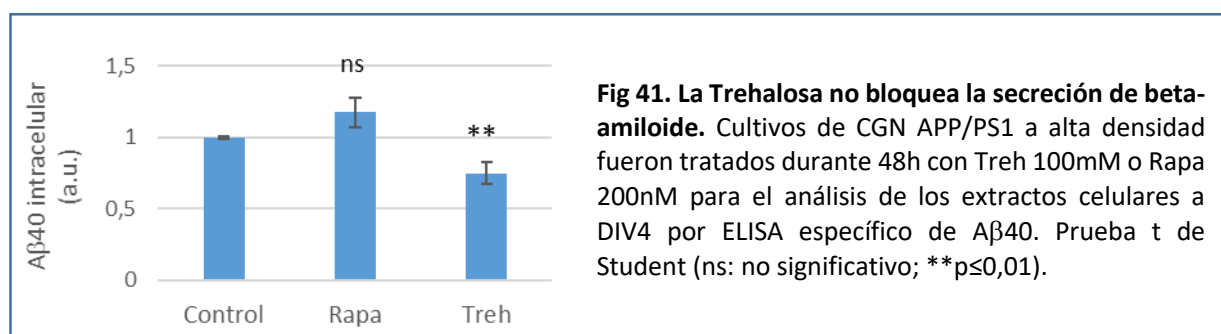
a) Cultivos de CGN WT fueron tratados durante 24h con Treh 100mM en presencia/ausencia de MRT 1uM o IN1 1uM para el análisis de los extractos celulares a DIV4 por western blot. Se usó NBR1 y LC3II como indicadores de flujo autofágico, y GAPDH como control interno. **b)** Cultivos de CGN APP/PS1 fueron tratados con Treh 100mM o Rapa 100nM durante 24 o 48h en presencia/ausencia de MRT (0,1-1uM) o IN1 (0,1-1uM). Los niveles de A β 40 en el medio extracelular a DIV4 se determinaron por ELISA específico. Los datos se normalizaron con respecto al control de 48 horas (100%). Análisis comparativo entre los tratamientos Treh o Rapa frente a su combinación con MRT/IN1 (grupo *Inhibición de autofagia*). ANOVA de dos factores (a 24 o 48h) (ns:no significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.5. La Trehalosa no induce el bloqueo de la secreción de A β , ni la endocitosis del ya secretado.

Puesto que los niveles de A β 40 cuantificados eran los presentes en el medio extracelular, nos preguntamos si la disminución observada con Trehalosa podría deberse a un déficit en la secreción, acumulando el péptido en el interior celular, o si por el contrario podría estar eliminando el ya secretado por endocitosis.

4.5.1. La Trehalosa no bloquea la secreción de A β 40.

Realizamos cultivos primarios de CGN APP/PS1 a alta densidad y, tras 48h de tratamiento, preparamos el extracto celular para medir por ELISA los niveles de A β 40 intracelulares (Fig 41). En el caso de Rapamicina pudimos apreciar un cierto incremento respecto al control no estadísticamente significativo. Sin embargo, en presencia de Trehalosa las neuronas no sólo no acumulaban el péptido, sino que incluso éste disminuía significativamente. Por tanto, la disminución de A β 40 extracelular con Trehalosa no se debería a un déficit en la secreción del mismo que provocara su acumulación intracelular.

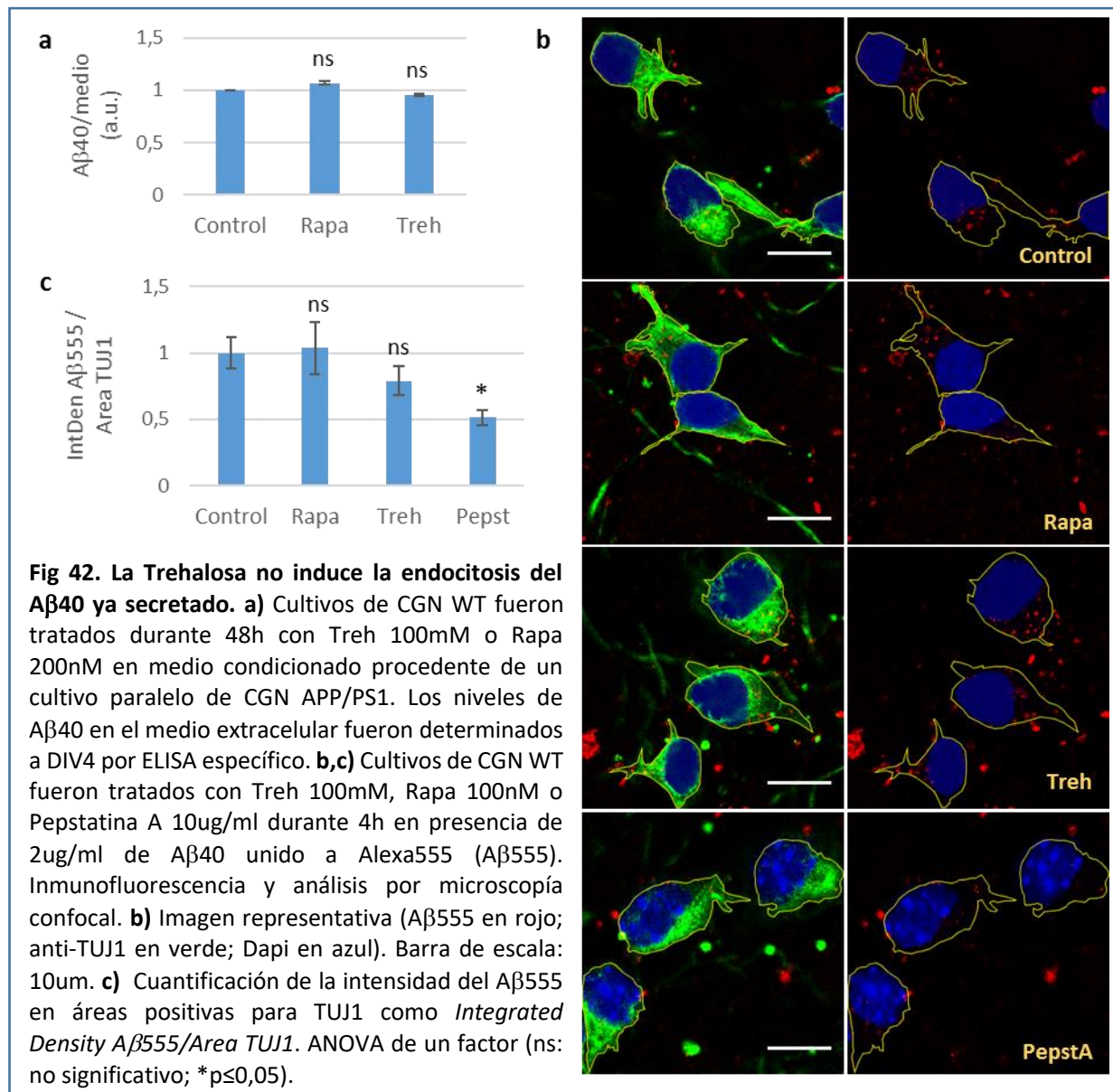


4.5.2. La Trehalosa no induce la endocitosis del A β 40 ya secretado.

Otra explicación alternativa para la reducción de amiloide inducida por Trehalosa es que el A β se endocite y se degrade de manera más eficiente en presencia de dicho azúcar. Para validar esta hipótesis, realizamos cultivos primarios de CGN WT, a los 2 días post-plaqueo les cambiamos el medio por medio condicionado procedente de un cultivo paralelo de CGN APP/PS1 y añadimos los tratamientos. 48h después, recogimos el medio extracelular y medimos el A β 40 presente por ELISA apreciamos cambios en los niveles de A β 40 intracelular al analizar los extractos celulares procedentes de un experimento análogo realizado a alta densidad celular (datos no mostrados).

Para comprobar este resultado, decidimos visualizar directamente la internalización de A β 40 marcado en la célula, según se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, partimos de cultivos de CGN de ratones WT y añadimos, junto con los tratamientos, A β 40 unido al fluoróforo Alexa555 (A β 555). Como control utilizamos Pepstatina A (10ug/ml), ya que se ha descrito que es capaz de bloquear el tráfico endocítico (Athanasakis et al., 2000). Usando microscopía confocal, cuantificamos la intensidad del A β 555 internalizado respecto al área neuronal, según describimos en Materiales y Métodos (Fig 42b, c). Mientras que al bloquear la endocitosis con Pepstatina, el A β 555 internalizado disminuía considerablemente, no pudimos apreciar diferencias significativas respecto al control al tratar las células con Trehalosa o Rapamicina.

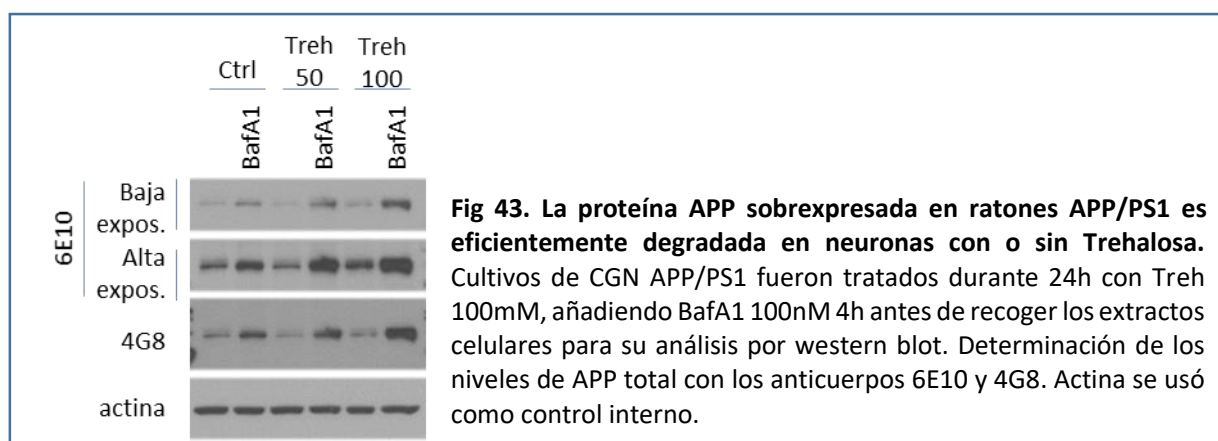
De acuerdo a los datos obtenidos, consideramos que la gran disminución de A β 40 secretado al medio por CGN APP/PS1 en presencia de Trehalosa no se debía a su endocitosis.



4.6. La Trehalosa disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP.

Examinados los posibles mecanismos de eliminación del péptido beta-amiloide, ya sea por su secreción o degradación mediada por autofagia o endocitosis, la siguiente alternativa a su reducción por Trehalosa era su menor generación a partir de la proteína precursora APP.

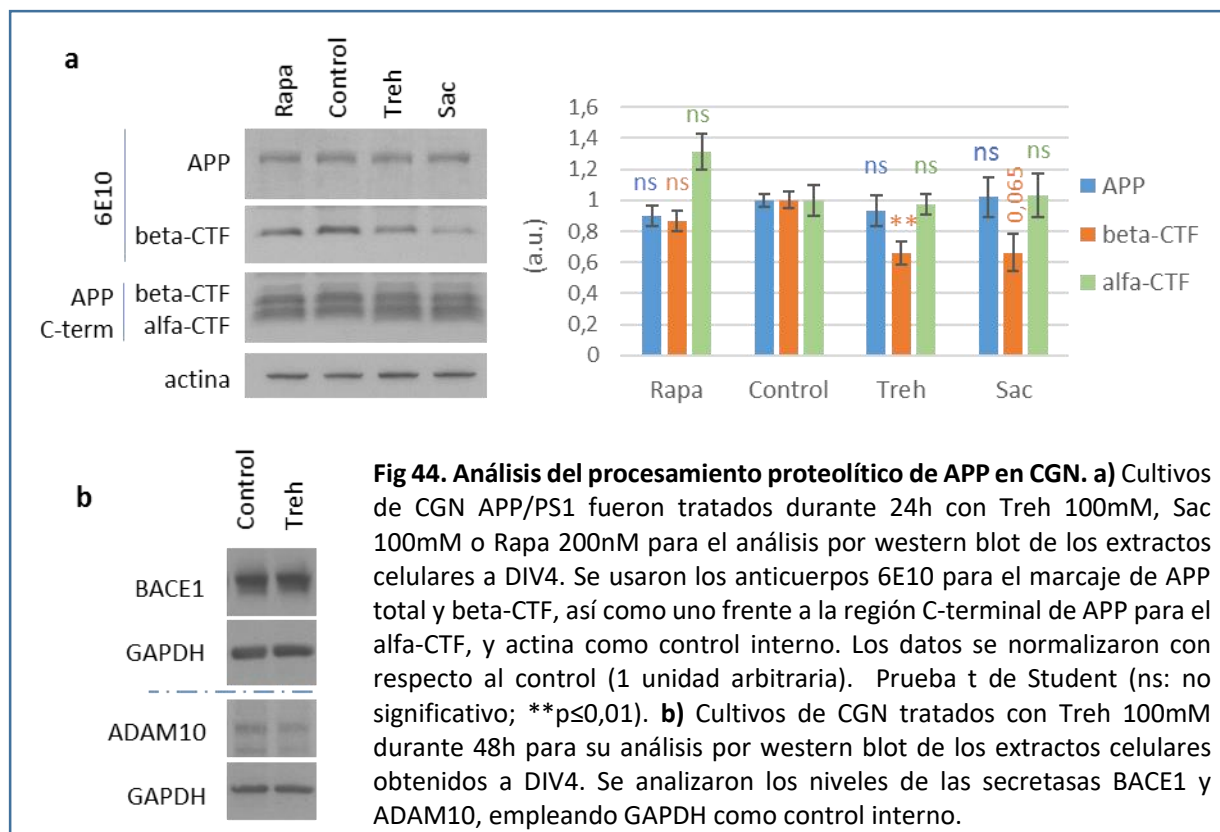
En primer lugar, comprobamos que la proteína APP sobrepresada en nuestro modelo de Alzheimer era degradada por lisosomas. Para ello, analizamos los niveles de APP total en neuronas transgénicas tratadas con Trehalosa durante 24h, bloqueando la degradación en las 4 últimas horas con Bafilomicina (Fig 43). Por western blot, observamos que APP se acumulaba en presencia de Bafilomicina, por lo que efectivamente esta proteína era translocada al lisosoma para su proteólisis, tanto en condiciones control como con Trehalosa.



Analizamos por western blot los niveles de la proteína APP, así como de los fragmentos CTF derivados de su procesamiento proteolítico amiloidogénico o no-amiloidogénico, por las actividades beta- y alfa-secretasa respectivamente (Fig 44a). No obtuvimos variaciones estadísticamente significativas entre tratamientos para los niveles totales de APP o del fragmento alfa-CTF (10KDa). En cambio, el tratamiento con Trehalosa generó una disminución significativa de un 30% del fragmento beta-CTF (12KDa). Al emplear otro disacárido como es Sacarosa, observamos una disminución similar de beta-CTF. Empleamos el anticuerpo 6E10 para detectar específicamente los niveles de beta-CTF, y el anticuerpo frente al carboxilo terminal de APP (APP C-term) para ambos CTFs (Fig 44a).

La reducción del fragmento beta-CTF era indicativo de un menor procesamiento de APP por la ruta amiloidogénica. Por tanto, analizamos por western blot los niveles totales de las principales proteasas descritas para dichos cortes alternativos en beta o alfa de APP, BACE1 y ADAM10 respectivamente. No encontramos diferencias significativas entre control y tratado con Trehalosa (Fig 44b).

Puesto que los niveles totales de APP, BACE1 o ADAM10 permanecían constantes, el menor procesamiento amiloidogénico observado con Trehalosa no era debido a una variación de la degradación o síntesis de dichas proteínas precursoras. Por tanto, su actividad sobre APP debería de estar afectada de alguna manera.

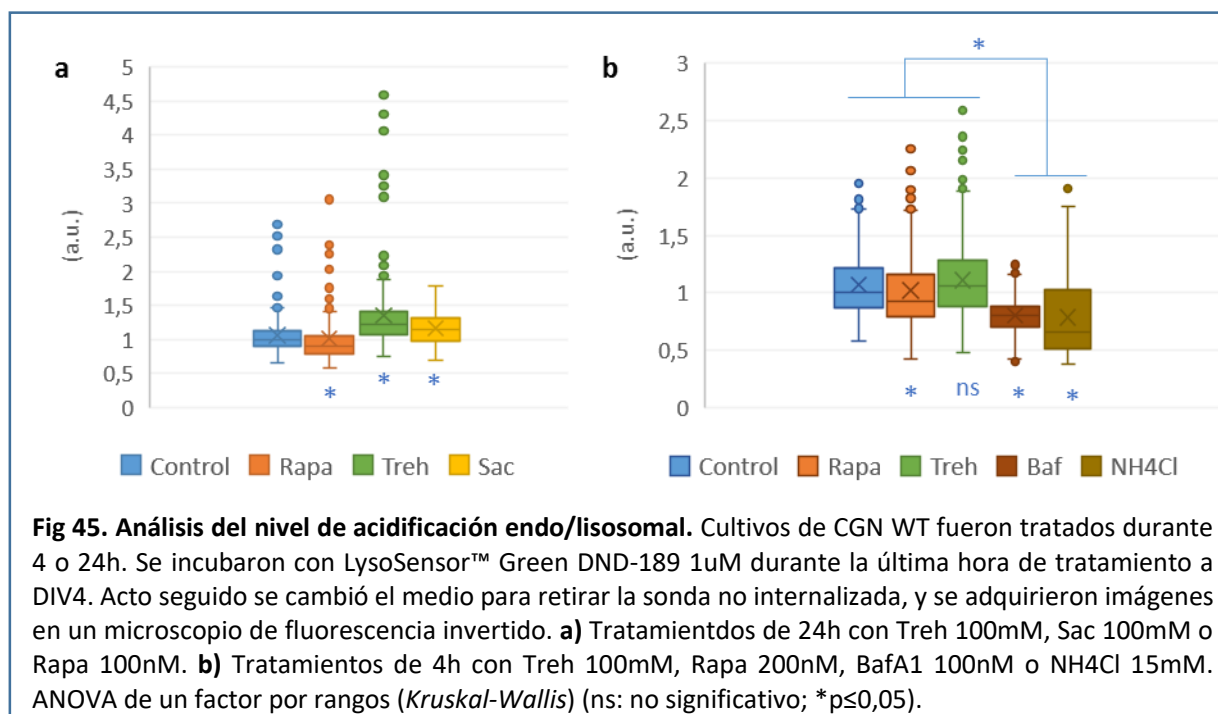


4.7. La Trehalosa modifica la morfología lisosomal sin alterar su funcionalidad o localización de APP y BACE1.

Está descrito que el corte amiloidogénico producido por la beta secretasa BACE1 se produce mayoritariamente en vesículas ácidas, como endosomas tardíos, tras la endocitosis de APP o su transporte desde el Golgi (Haass et al., 2012). BACE1, como otras aspartil-proteasas como la cathepsina D, necesita un pH ácido para una óptima actividad endoproteolítica (Schechter and Ziv, 2008; Araki, 2016). La Trehalosa, al afectar al sistema de endomembranas, podría estar modificando el pH de estas vesículas y, por lo tanto, alterar la actividad de estas aspartil-proteasas (Tien et al., 2016).

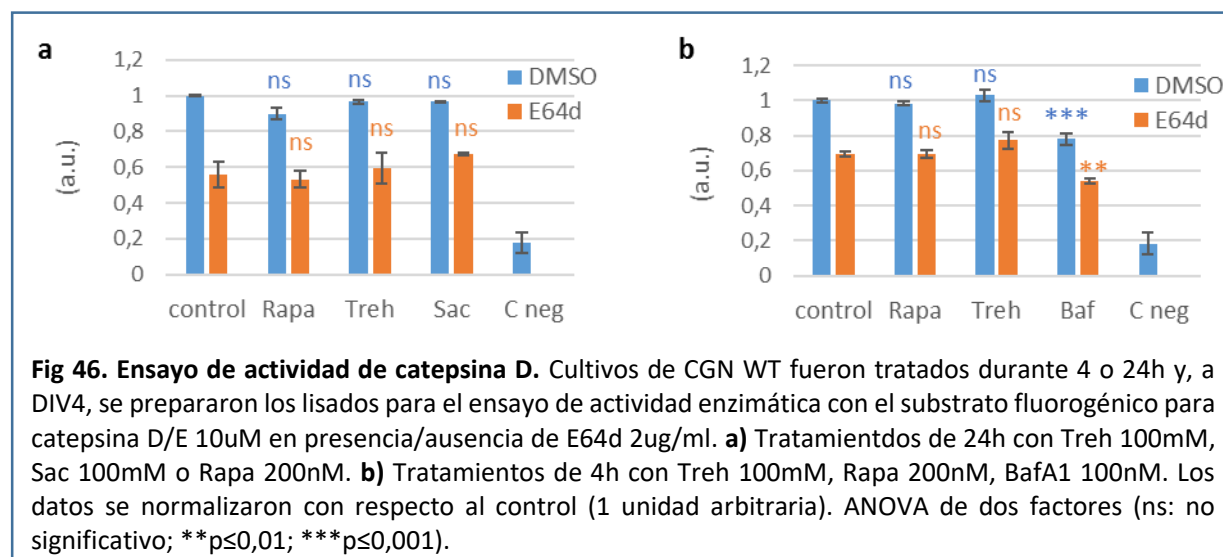
4.7.1. La Trehalosa no basifica las vesículas con pH ácido, necesario para la actividad beta-secretasa.

Para determinar si la Trehalosa estaba modificando la acidificación del sistema endo-lisosomal empleamos la sonda fluorescente LysoSensor™ Green DND-189, según describimos en Materiales y Métodos. Esta sonda aumenta la intensidad de fluorescencia cuanto menor es el pH, marcando exclusivamente los compartimentos ácidos. Realizamos cultivos primarios de CGN a baja densidad y los tratamos durante 24h (Fig 45a) o 4h (Fig 45b) con Trehalosa 100mM. Empleamos Bafilomicina 100nM y NH₄Cl 15mM durante 4h como controles de basificación endolisosomal (Fig 45b). También utilizamos Rapamicina 100nM como control de inducción de autofagia y analizamos el efecto a largo plazo de otro disacárido, Sacarosa a 100mM (Fig 45a). Mientras que tanto la Bafilomicina como el NH₄Cl disminuyeron significativamente la intensidad de fluorescencia, Trehalosa no basificó los compartimentos a ningún tiempo respecto al control. Los resultados con Rapamicina y Sacarosa fueron análogos (Fig 45a, b).



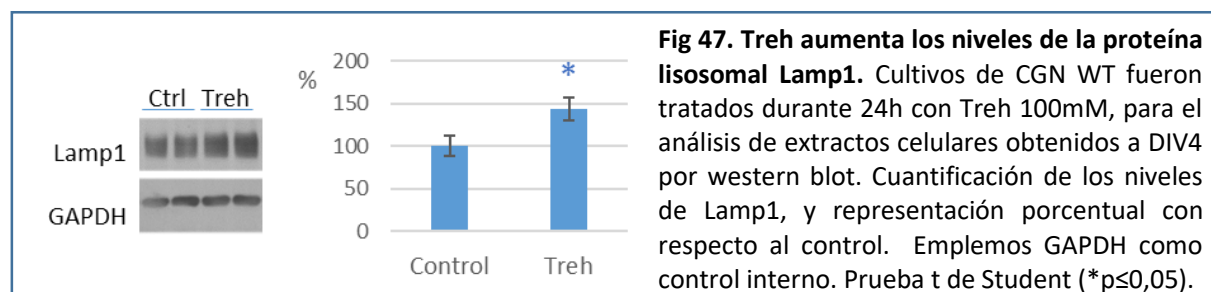
Para comprobar que la Trehalosa no estaba paralizando la proteólisis dependiente de pH, realizamos ensayos de actividad enzimática de la cathepsina D, la principal aspartil proteasa endolisosomal, según describimos en Materiales y Métodos (Fig 46). Empleamos un sustrato fluorogénico sensible a cathepsina D y E, aunque un experimento preliminar con el inhibidor Pepstatina

A nos permitió asumir que la actividad observada correspondía en su totalidad a la catepsina D (datos no mostrados). En paralelo, empleamos el inhibidor E64d para impedir la activación adicional de catepsina D por cisteín-proteasas durante la incubación (Laurent-Matha et al., 2006; Stoka et al., 2016). Puesto que la disminución de la señal en presencia de E64d fue proporcional en todas las muestras, descartamos una posible variación de regulación por cisteín-proteasas con los tratamientos (Fig 46a, b). Mientras que el tratamiento a corto plazo con Bafilomicina generaba una significativa reducción de la actividad de la catepsina D (Fig 46b), ninguno de los disacáridos presentó este efecto a los tiempos testados (Fig 46a, b). Tampoco obtuvimos cambios significativos con el control de autofagia Rapamicina.



4.7.2. La Trehalosa aumenta el tamaño lisosomal sin afectar a la localización de las proteínas APP y BACE1 al mismo.

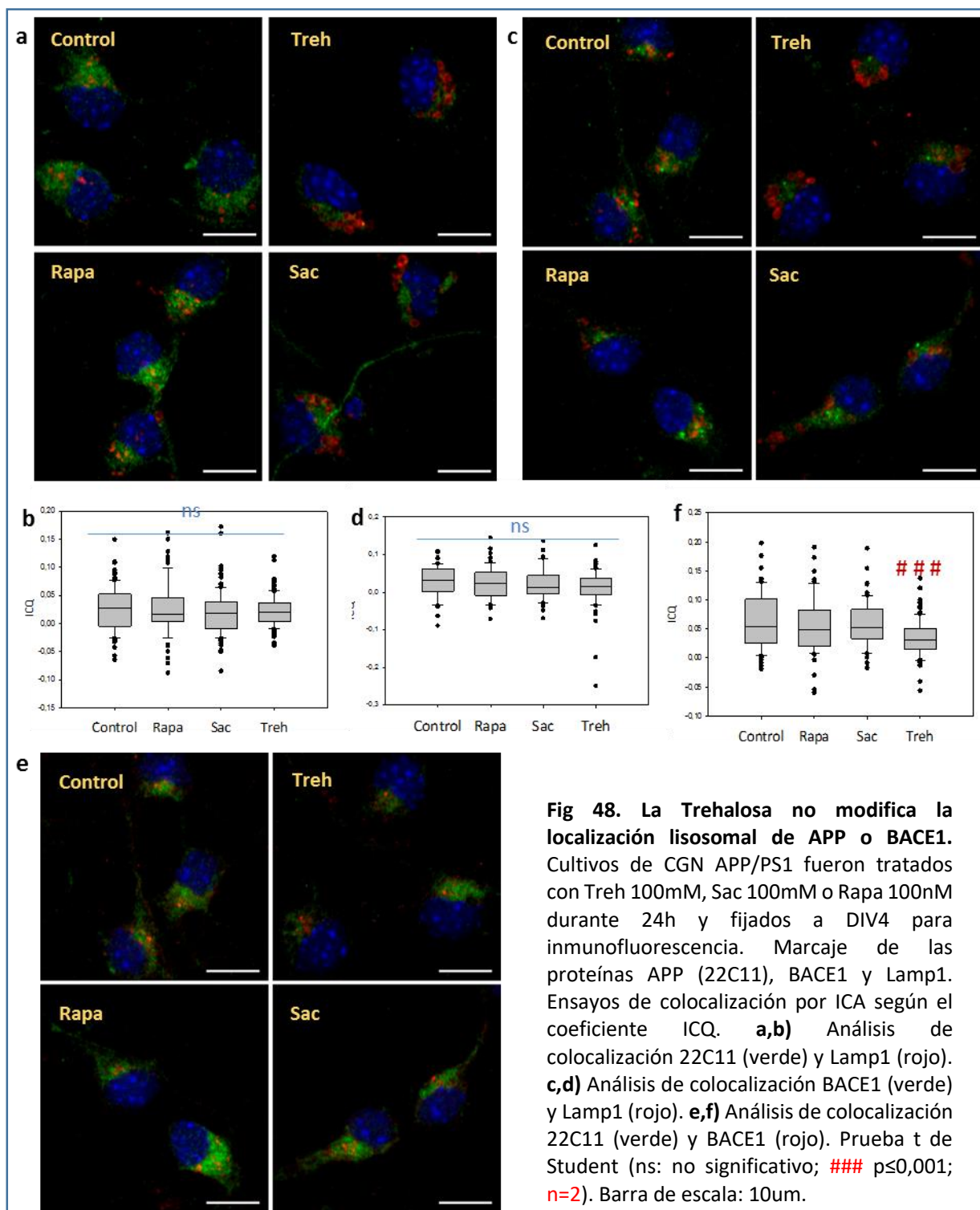
Al realizar el ensayo in vivo con LysoSensor, nos llamó la atención el aumento del tamaño lisosomal tanto en las células tratadas con Trehalosa como con Sacarosa. En cultivos paralelos verificamos el incremento lisosomal con Trehalosa al analizar por western blot los niveles del marcador lisosomal lamp1 (Fig 47). Nos preguntamos si este efecto podría generar una distribución diferente de las proteínas APP y BACE1 que impidiera su interacción.



Realizamos un ensayo preliminar de colocalización entre el marcador lisosomal lamp1 y las proteínas APP (22C11) o BACE1, en cultivos CGN APP/PS1 tratados durante 24h (Fig48a-b, c-d). Como indicamos en Materiales y Métodos, el grado de colocalización se calculó con el algoritmo ICA y el coeficiente de correlación ICQ. No apreciamos diferencias entre los tratamientos al analizar la

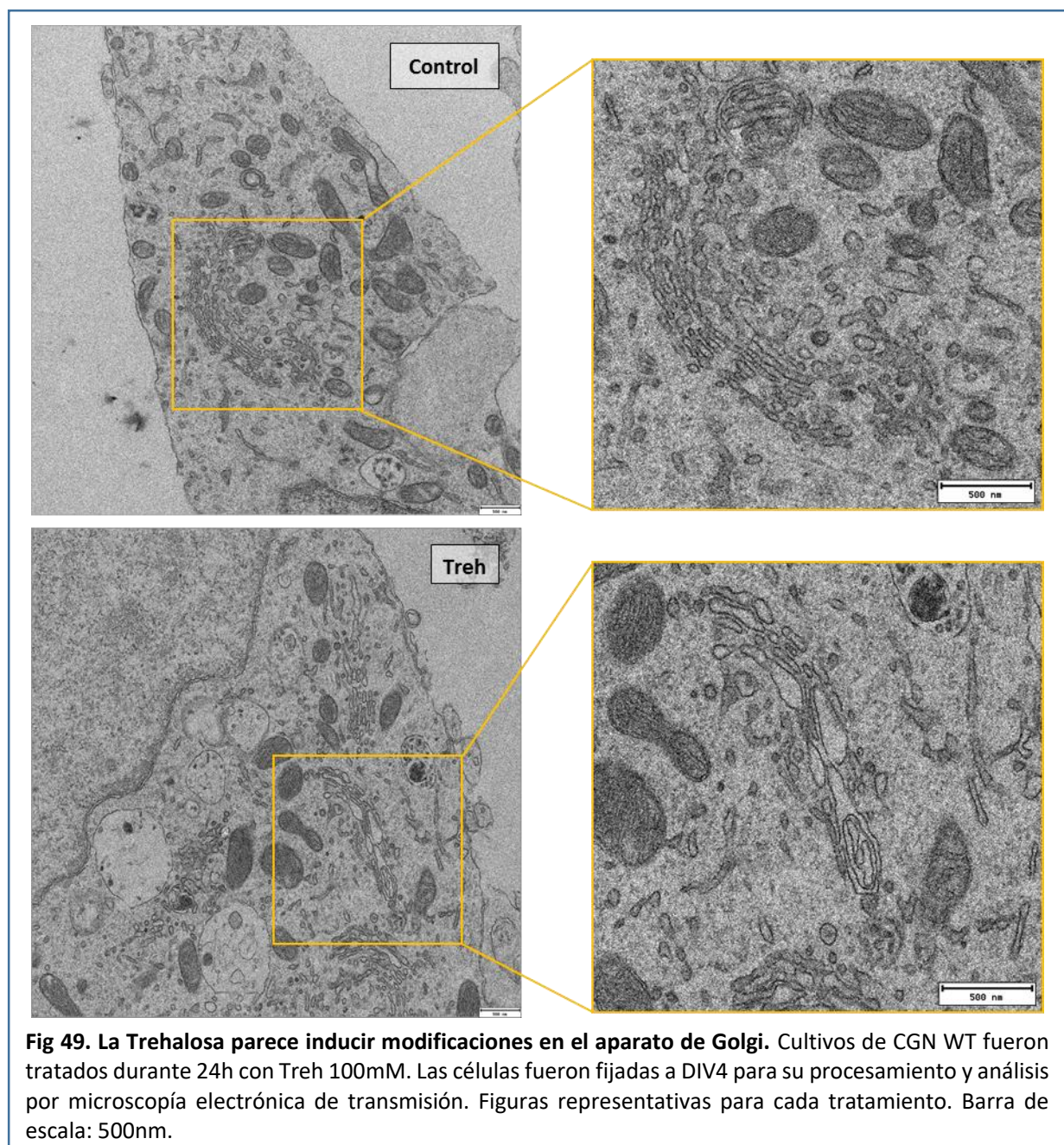
colocalización APP-lamp1 (Fig 48a-b) o BACE1-lamp1 (Fig 48c-d), y por lo tanto en la localización lisosomal de ambas proteínas.

No obstante, al analizar la colocalización entre APP y BACE1 en toda la célula, obtuvimos una disminución en el coeficiente ICQ con el tratamiento de Trehalosa (Fig 48e-f). Este dato indicaba una distribución celular diferente de ambas proteínas, lo que podría disminuir su interacción y, por lo tanto, el procesamiento amiloidogénico.

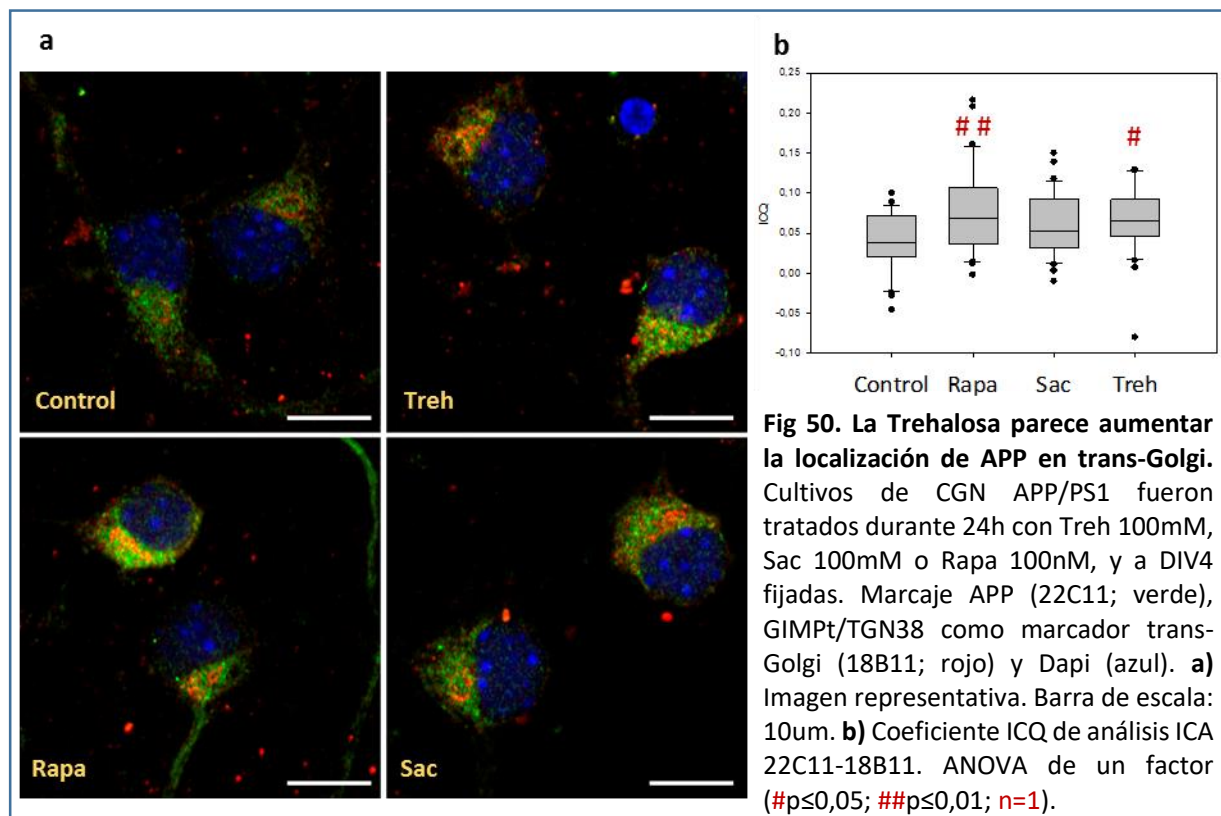


4.8. La Trehalosa podría generar cambios en el tránsito cis-trans Golgi que segregasen las proteínas APP y BACE1.

Quisimos averiguar qué otros procesos celulares podría estar modificando la Trehalosa que desencadenasen la diferente distribución de las proteínas APP y BACE1 en la célula. Como primera aproximación, obtuvimos imágenes del interior celular con microscopía electrónica de transmisión a partir de cultivos de CGN tratados durante 24h con Trehalosa 100mM (Fig 49). En las neuronas tratadas con Trehalosa, pudimos apreciar una mayor presencia de vesículas, probablemente las observadas previamente como lamp1 positivas. Además de esto, nos llamó la atención la apariencia del aparato de Golgi, ya que en las células tratadas con Trehalosa, éste tendía a ser más laxo, con cisternas más anchas, frente a un aparato de Golgi con cisternas más estrechas y paralelas en situación control (Fig 49). Esta observación nos llevó a analizar la distribución de las proteínas APP y BACE1 respecto a marcadores del Golgi.

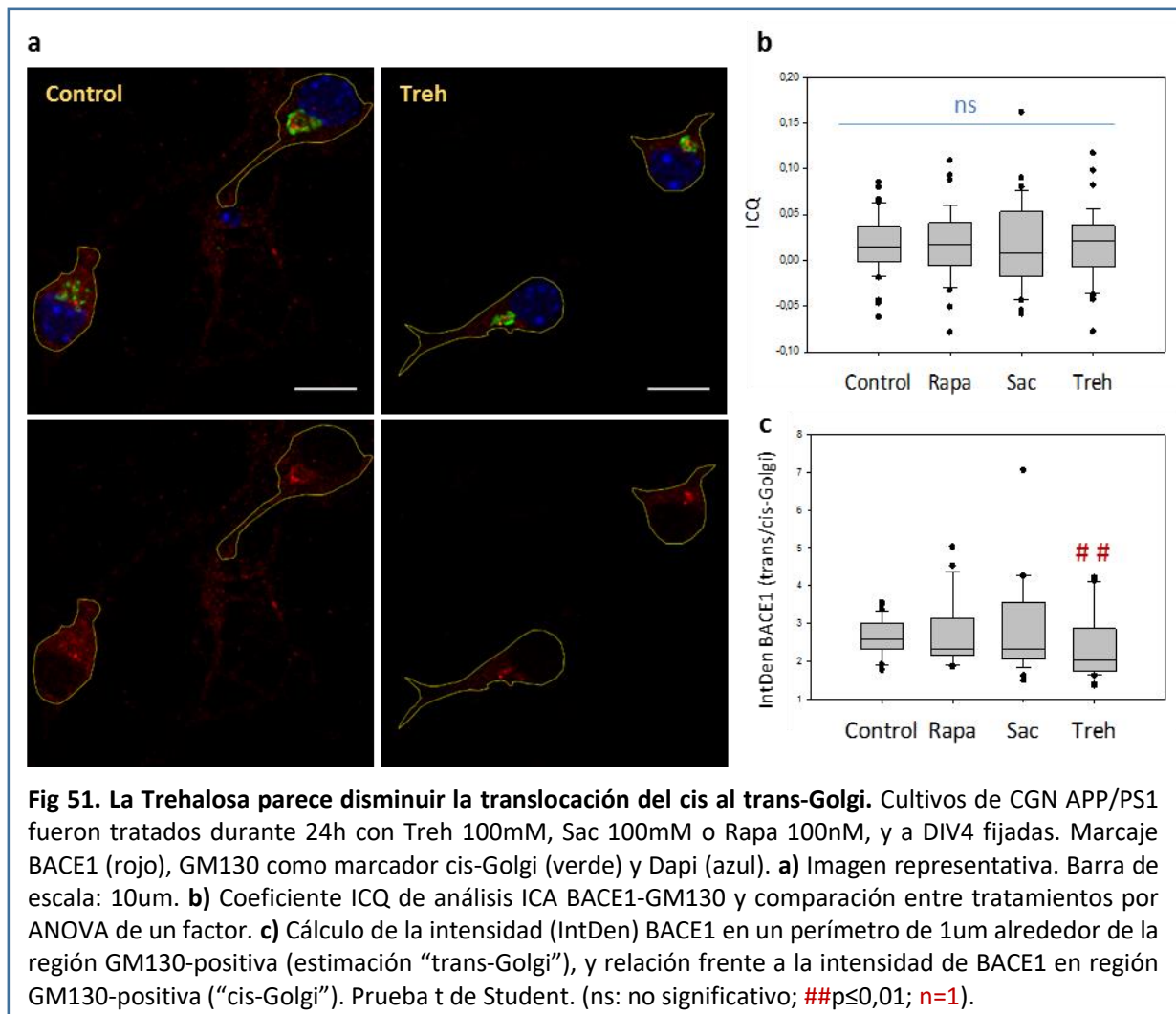


Realizamos un ensayo preliminar de colocalización entre APP (22C11) y la proteína de la red trans-Golgi GIMPt/TGN38 con el anticuerpo 18B11 (Yuan et al., 1987) (Fig 50a, b). Observamos un aumento en la correlación según el coeficiente ICQ con los tratamientos de Rapamicina y Trehalosa respecto al control. Desafortunadamente, por incompatibilidad de secundarios, no pudimos realizar la colocalización equivalente con BACE1.



Realizamos el doble marcaje de BACE1 con el marcador del cis-Golgi GM130, aunque no observamos cambios en el grado de correlación por ICQ (Fig 51a, b). Como aproximación preliminar del grado de translocación del cis al trans-Golgi, calculamos la relación entre la intensidad de BACE1 en un perímetro de 1um alrededor del cis-Golgi (GM130) frente a la intensidad de BACE1 contenida en dicha área GM130-positiva. Este análisis se llevó a cabo mediante funciones del ROI Manager (ImageJ), empleando los valores de Integrated density (IntDen) para suprimir el efecto del área en la señal media de cada imagen. Obtuvimos una disminución estadísticamente significativa para la relación trans/cis del tratamiento de Trehalosa respecto al control (Fig 51c).

Una menor tasa de translocación de BACE1 a la región trans-Golgi, junto con una mayor presencia de APP en la misma, apoya la menor colocalización entre APP y BACE1 observada con Trehalosa. No obstante, este resultado es una aproximación indirecta preliminar, siendo imprescindible un experimento de colocalización frente a BACE1 con un marcaje específico de la red trans-Golgi.



4.9. Conclusiones:

- La Trehalosa presenta un efecto doble en el tiempo: mientras que a corto plazo aumenta el flujo autofágico, a largo plazo modifica el sistema de endomembranas sin alterar la degradación mediada por autofagia.
- La Trehalosa disminuye los niveles de Aβ40 secretados al medio por CGN de ratones APP/PS1, de manera independiente de autofagia. Este efecto no es consecuencia de un almacenamiento intracelular del péptido o de su eliminación *a posteriori* por endocitosis y degradación lisosomal.
- La Trehalosa disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP, sin alterar significativamente los niveles o funcionalidad de las proteínas implicadas analizadas.
- Según datos preliminares, planteamos un modelo del mecanismo de reducción del péptido beta-amiloide por el tratamiento prolongado de Trehalosa en cultivos primarios de CGN. La Trehalosa genera alteraciones en el aparato de Golgi que conllevan la segregación de las proteínas APP y BACE1. Al estar físicamente separadas en la célula, disminuye su interacción y por lo tanto el procesamiento proteolítico amiloidogénico. Este mecanismo sería independiente de vesículas endo-lisomales lamp1-positivas que, a pesar de sus cambios morfológicos, no presentaban cambios en su pH o en la localización de dichas proteínas.

DISCUSIÓN

El propósito general de esta Tesis fue analizar el funcionamiento de la autofagia en neuronas en condiciones fisiológicas normales, así como su implicación en una situación patológica. Para esto último, nos hemos centrado en un ratón modelo de la enfermedad de Alzheimer, con mutaciones asociadas a la misma en los genes humanos APP y Presenilina 1. Estas mutaciones desencadenan la acumulación del péptido beta-amiloide que, según la hipótesis de la cascada amiloidogénica, provocarán los subsecuentes procesos patológicos de la enfermedad (Selkoe and Hardy, 2016). Así, tanto por los depósitos proteicos de A β en placas seniles, como por la acumulación de tau en ovillos neurofibrilares, la EA se considera una proteínopatía. Como tal, se ha descrito un desbalance de los mecanismos proteostáticos, concretamente de la autofagia, como describimos en la introducción. Así, se han descrito diversos factores que correlacionan la EA con una disfunción en la degradación por autofagia, tanto en casos familiares como esporádicos. Así, la sobreexpresión de APP o su mutación provocaría una sobrecarga de los procesos de degradación proteica, pero además PS1 mutado afectaría a la acidificación lisosomal (Lee et al., 2010). Por otro lado, también existe una predisposición asociada al gen ApoE, que parece afectar al transporte del colesterol y al consecuente funcionamiento del sistema de endomembranas (Bagyinszky et al., 2014), o a PICALM, que parece afectar a diferentes etapas del mecanismo de autofagia (Menzies et al., 2017).

No obstante, existe cierta controversia sobre si la disfunción de la autofagia, y por tanto empeoramiento de la proteostasis neuronal, es causa o consecuencia de la patología de Alzheimer. Por un lado, si bien la autofagia no está directamente relacionada con el procesamiento amiloidogénico de APP (Boland et al., 2010), un fallo en la degradación lisosomal pondría a disposición fragmentos beta-CTF sin degradar o proteínas APP en un entorno ácido óptimo para la actividad de BACE1, y por lo tanto contribuir a la producción de A β (Yu et al., 2005; Gowrishankar et al., 2015). Por lo tanto, la estimulación de autofagia sería contraproducente. Por otro lado, una mayor autofagia podría ser la respuesta neuronal para degradar el exceso de A β , y que la saturación de este mecanismo proteostático fuera producto de la patología. En ambos casos, una mejora en el flujo autofágico global, incluida la función lisosomal, podría ser beneficiosa.

Por tanto, para abordar el controvertido papel de la autofagia en Alzheimer, empleamos como modelo de amiloidogénesis el ratón doble transgénico APP/PS1, que forma acúmulos del péptido amiloide humano en cerebro a partir de los dos meses de edad. Así, analizamos la regulación de la autofagia basal e inducida tanto en neuronas provenientes de ratones APP/PS1 como de sus hermanos de camada *wild-type*. Asimismo, analizamos la repercusión de su modulación en la amiloidogénesis del ratón APP/PS1 tanto *in vivo* como en neuronas *ex vivo*. Para ello, modulamos diferentes vías de señalización implicadas en la regulación de autofagia, como la diana de Rapamicina mTORC1 o AMPK.

1. La inducción de autofagia con Rapamicina genera una disminución de la amiloidosis en cerebro y en neuronas aisladas.

Nuestros resultados sostienen que la inducción de autofagia es capaz de reducir los niveles de beta-amiloide. Esto pudimos comprobarlo al administrar el inhibidor de mTORC1 Rapamicina tanto *in vivo* como en neuronas *ex vivo* de nuestro modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

En primer lugar, los experimentos preliminares de administración de Rapamicina a ratones nos indicó que ésta era capaz de llegar a cerebro tras su inyección intraperitoneal. Así, tras la administración de Rapamicina a ratones APP/PS1 durante dos meses, pudimos observar una disminución de los niveles de A β , en comparación con el grupo control, tanto en cerebro como en plasma sanguíneo. Los menores niveles de P62, así como de LC3II, en cerebro nos indicaron un efecto de Rapamicina en autofagia, presumiblemente por la inhibición de mTORC1 según sus dianas de fosforilación. Además, la modificación de los niveles de fosforilación de Tau, nos indicó una repercusión del tratamiento en neuronas.

Realizamos cultivos primarios para poder corroborar los efectos específicos en neuronas respecto del resto de tipos celulares presentes en cerebro. Los experimentos de flujo a tiempos cortos, así como los de degradación a tiempos más largos, nos indicaron una eficiente inducción de autofagia por Rapamicina en neuronas, atendiendo a los niveles los marcadores específicos LC3II, NBR1 y P62. Por otro lado, verificamos que el efecto antiamiloidogénico en neuronas de la Rapamicina estaba efectivamente mediado por la ligera inducción de autofagia, ya que era completamente revertido por los inhibidores de formación del autofagosoma MRT68921 y VPS34-IN1. Estos inhibidores no solo revirtieron la disminución del beta-amiloide secretado al inducir autofagia, sino que también aumentaron la secreción de beta-amiloide en ausencia de Rapamicina, confirmando que la autofagia basal presente en la neurona también contribuye a la eliminación del péptido.

Acorde con nuestros resultados en ratones APP/PS1, en los últimos años diversos grupos de investigación han observado efectos neuroprotectores en otros modelos murinos de la EA, como las líneas 3xTg-AD, Tg2576 o PDAPP, al revertir la hiperactivación de mTORC1 observada en pacientes de la EA e inducir autofagia (Caccamo et al., 2010; Spilman et al., 2010; Caccamo et al., 2014), pero también al disminuir los niveles de síntesis proteica (Caccamo et al., 2014; Caccamo et al., 2015). No obstante, también ha habido cierta controversia sobre la repercusión de Rapamicina en la enfermedad, como la existencia de un efecto amiloidogénico al inhibir la actividad de la alfa-secretasa ADAM10 (Zhang et al., 2010). Además, al administrar Rapamicina durante dos meses a los ratones, como efecto secundario observamos una disminución de la capacidad de cicatrización de pequeñas heridas que se habían hecho, así como una disminución del peso corporal respecto al grupo control. Estos resultados podrían estar acordes con la capacidad inmunosupresora de la Rapamicina descrita, cuyos efectos secundarios indeseados han puesto en entredicho su empleo para tratamientos crónicos (Richardson et al., 2015).

2. Regulación de la señalización celular de la autofagia en neuronas.

Nuestros resultados indicaban una moderada inducción de autofagia por Rapamicina en sistemas neuronales en comparación con el drástico aumento descrito para este compuesto en la bibliografía. No obstante, a pesar de su implicación en neurodegeneración, la autofagia ha sido principalmente caracterizada en levaduras y en células de mamífero no neuronales (Kabeya et al., 2000; Klionsky et al., 2016). Por tanto, esta peculiaridad puede deberse a las enormes diferencias metabólicas existentes frente a líneas celulares inmortalizadas con altas tasas de división y carácter tumoral. Las neuronas en cambio requieren una estricta regulación proteostática acorde con su

naturaleza postmitótica, altamente polarizada y compartimentalizada, y a sus elevadas necesidades energéticas (Ariosa and Klionsky, 2016).

Verificamos que la ligera inducción de autofagia observada era connatural al linaje neuronal, ya que era reproducida en diferentes sistemas de medición de flujo y por otros mecanismos de inhibición de mTORC1, así como por el inductor independiente de mTORC1 Calpeptina. Además, al analizar la respuesta autofágica a Rapamicina en líneas celulares procedentes de neuroblastoma, observamos cierta similitud entre neuronas primarias de cerebelo y SH-SY5Y, mientras que las células N1E-115 mostraron una mayor inducción de autofagia en respuesta al tratamiento con Rapamicina, probablemente debido a un metabolismo asociado a un fenotipo más tumoral con mayores tasas de división. Por tanto, elegimos el linaje SH-SY5Y como sistema neuronal modelo para su estudio.

Conforme a nuestros resultados, algunos estudios realizados en neuronas han mostrado ciertas discrepancias con los mecanismos de regulación de autofagia generales (Tsvetkov et al., 2009). Pero también se han descrito diferencias entre neuronas primarias y células de neuroblastoma como SH-SY5Y (Moruno Manchon et al., 2016) o N2A (Kruger et al., 2012), así como en la eficiencia de degradación por autofagia entre diferentes tipos de neuronas (Tsvetkov et al., 2013). Por tanto, el análisis en neuronas de las rutas implicadas en la inducción de autofagia es imprescindible para el desarrollo y optimización de estrategias neuroprotectoras basadas en este proceso frente a proteinopatías como la EA. Según nuestros datos, puesto que la Rapamicina inducía una autofagia discreta pese a que inhibía mTORC1 eficientemente, cabe preguntar qué otros mecanismos de señalización podrían intervenir en la regulación de autofagia en neuronas.

2.1. PI3KCI-mTORC1 en la regulación de la autofagia en neuronas.

La inhibición de mTORC1, por Rapamicina o privación de nutrientes, es la estrategia más empleada para la inducción de autofagia. Como ya hemos mencionado, nuestros resultados mostraron un efecto moderado en neuronas. Esto podría considerarse un reflejo de la controversia sobre su eficiencia en neuronas existente hasta la fecha. Mientras ciertos grupos de investigación sostienen su efectividad (Boland et al., 2008; Menzies et al., 2010; Rubinsztein and Nixon, 2010), otros la cuestionan (Tsvetkov et al., 2009; Roscic et al., 2011; Kruger et al., 2012). Nuestros datos sostienen la ligera inducción de autofagia por Rapamicina tanto a tiempos cortos como largos, cuando llegaba a afectar negativamente a la actividad de mTORC2 (Sarbasov et al., 2006). Si bien se ha descrito que la inhibición de mTORC2 podría afectar negativamente al inicio de la autofagia (Renna et al., 2013), no apreciamos este efecto con nuestros datos.

Se ha descrito que determinados aminoácidos, como leucina y glutamina, tienen un papel esencial en la regulación de mTORC1 (Carroll et al., 2015). Por tanto, elegimos la privación de glutamina como otro mecanismo de inhibición de mTORC1. La falta de glutamina en neuronas CGN mostró una disminución de P62 a largo plazo similar a la observada con Rapamicina, acorde a una inducción de autofagia por inhibición de mTORC1. Dicha inhibición de mTORC1 se produjo presumiblemente a través de su regulación Arf1-vATPasa-Ragulator-RAGs (Jewell et al., 2015) ya que los mayores niveles de fosforilación de PRAS40 indicaron una mayor actividad de Akt, posiblemente como mecanismo compensatorio para tratar de reactivar mTORC1. No obstante, al ajustar las condiciones de crecimiento de las células SH-SY5Y, pudimos apreciar un efecto de la vía PI3KCI-Akt en autofagia independiente de

mTORC1. Al comparar las diferentes condiciones de medios, suplementos tróficos y presencia/ausencia de glutamina, observamos que los niveles de NBR1, P62 y LC3 correlacionaban con la fosforilación de PRAS40 por Akt. Esto podría ser indicativo de un papel regulador de autofagia por Akt de manera independiente de mTORC1. Acorde con este resultado, recientemente se ha descrito que Akt inhibe por fosforilación directa al factor de transcripción proautofágico TFEB (Palmieri et al., 2017), así como a AMPK-alfa1 (Hawley et al., 2014) y Beclin-1 (Wang et al., 2012).

2.2. AMPK en la regulación de autofagia en neuronas.

Otro gran modulador del inicio de la autofagia descrito es AMPK, tanto de manera dependiente como independiente de mTORC1 (Kim et al., 2011; Kim et al., 2013). Esta quinasa constituye otro gran nodo de integración de señales como los niveles de AMP/ATP, de nutrientes como aminoácidos o glucosa, o del estatus mitocondrial. Por tanto, quisimos analizar su implicación particular en la regulación de este proceso degradativo en neuronas, y comprobar si podría haber un efecto sinérgico entre ambas vías, de acuerdo con los mecanismos moleculares descritos hasta la fecha. Empleamos compuestos químicos moduladores de la actividad AMPK por diferentes mecanismos: 2DG, Metformina, AICAR y Compuesto C (CoC).

Los compuestos 2DG, Metformina y AICAR activaron eficientemente la ruta AMPK e incluso aumentaron la fosforilación pro-autofágica de ULK por esta quinasa. Sin embargo, no pudimos observar un incremento del flujo autofágico por los activadores de AMPK ni solos ni en combinación con la inhibición de mTORC1 por Rapamicina. No obstante, se han descrito efectos independientes de AMPK para estos tres compuestos (Vincent et al., 2015). Una posible explicación para los datos de Metformina podría ser la inhibición de la vía proautofágica JNK (datos no mostrados), acorde a la bibliografía (Dai et al., 2015). No observamos dicha inhibición de JNK en el caso de AICAR o 2DG, aunque el efecto de estos compuestos en la bibliografía tampoco es concluyente (Che et al., 2015; Dai et al., 2015; Shen et al., 2016).

En cambio, la inhibición de AMPK con Compuesto C sí que generó el esperado bloqueo del flujo autofágico tanto en el linaje neuronal SH-SY5Y como en cultivos primarios de neuronas. No obstante, pudimos apreciar ciertas diferencias entre ambos sistemas neuronales. A diferencia de los cultivos de CGN, en SH-SY5Y CoC generó una inhibición de la vía de mTORC1 y un aumento de los niveles de LC3II. No obstante, comprobamos que no había un aumento de flujo autofágico dependiente de mTORC1 con CoC, a diferencia de lo anteriormente descrito por (Vucicevic et al., 2011). Además, la reversión de la inhibición de mTORC1 por sobreexpresión de Rheb constitutivo activo no modificó el aumento de LC3II observado con CoC, por lo que dicho efecto del compuesto era independiente de esta vía de señalización. Puesto que el efecto observado en SH-SY5Y con CoC no depende de mTORC1 y en CGN no inhibe mTORC1, estas diferencias entre ambos sistemas neuronales han de explicarse por un mecanismo independiente de mTORC1.

Los menores niveles de LC3II y NBR1 con CoC en CGN, así como su menor acumulación con Bafilomicina, parecían ser un indicativo de represión de la inducción de autofagia, más que de la degradación lisosomal. Este resultado sería acorde con una reversión de la actividad AMPK en la inducción de autofagia descrita. Como el efecto de CoC observado en los mismos marcadores en SH-SY5Y resultó ser independiente de mTORC1, postulamos que el mecanismo era análogo al dependiente

de AMPK observado en CGN. Puesto que existe una compleja regulación del inicio de la formación del autofagosoma y de la actividad PIK3/Vps34 en varios complejos por AMPK (Kim et al., 2013), es posible que variaciones en los niveles de distintas proteínas entre SH-SY5Y y CGN estén implicadas en la respuesta ante CoC. Así, hipotetizamos que los mayores niveles de LC3II y NBR1 observados en SH-SY5Y corresponden a fagoporos inmaduros que no finalizan la formación inicial del autofagosoma por la inhibición de AMPK. Esto podría explicar las diferencias entre estos marcadores con la proteína de larga duración P62, ya que ésta se acumula con Bafilomicina pero no con CoC, mientras que NBR1 y LC3II se acumulan en ambos casos en SH-SY5Y. Esto estaría acorde con una inhibición de autofagia por CoC a nivel de inducción en ambos sistemas neuronales, acorde con el papel regulador de la AMPK descrito, y no de degradación.

Estos resultados evidencian la necesidad de comprobación de los mecanismos regulatorios de autofagia en neuronas primarias, pese a la similitud existente con líneas celulares procedentes de neuroblastoma. Con los compuestos analizados, podemos concluir que si bien una activación de AMPK no aumentó la tasa de degradación mediada por autofagia, su actividad basal era necesaria para el correcto funcionamiento de la misma. Por tanto, habría que considerar la posible existencia de mecanismos más complejos de regulación de la autofagia en neuronas, en los que podría participar la AMPK.

3. Regulación de los niveles de A β y fosfo-Tau por los moduladores de AMPK: mecanismos independientes de autofagia.

3.1. Efecto de los moduladores de AMPK en amiloidogénesis neuronal.

A pesar de la disminución del flujo autofágico observada con los activadores de la AMPK, nos llamó la atención que su inhibición con CoC generara un bloqueo en el sistema, acorde con el papel regulador de AMPK descrito en autofagia. Por ello, quisimos comprobar si los moduladores de AMPK tenían algún efecto en la producción de A β , bien por un efecto en autofagia no detectado o por otro mecanismo. Obtuvimos efectos antagónicos entre los activadores de AMPK, mayoritariamente entre la disminución de beta-amiloide producida por Metformina y el incremento por AICAR. 2DG también generó cierta reducción amiloide, aunque la activación de AMPK a largo plazo no fue tan relevante a dosis no tóxicas. Considerando que la autofagia podría estar implicada en dicha reducción amiloidogénica, pese a no detectar su aumento, procedimos a su prevención con los inhibidores de la formación del autofagosoma MRT/IN1. No obstante, no conseguimos apreciar cambios en los niveles de A β secretados con dichos inhibidores respecto a los diferentes moduladores de AMPK. Esto podría deberse a un efecto redundante en cuanto a la disminución del flujo autofágico, aunque los efectos altamente tóxicos derivados de la combinación de tratamientos nos impidió obtener un resultado aclaratorio. Lo mismo ocurría en el caso del CoC, que inhibía la inducción de autofagia AMPK dependiente. Nos llamó la atención que el CoC no aumentase los niveles de A β 40, hecho esperado si, al igual que MRT e IN1, actuaba a nivel de inicio de flujo disminuyéndolo y por lo tanto reduciendo su eliminación.

Por otro lado, la administración conjunta con CoC inhibió la activación de AMPK por los compuestos Metformina, AICAR y 2DG. No obstante, el CoC sólo revirtió el incremento de amiloide con AICAR, mientras que no afectó a los niveles de A β secretados con Metformina, Rapamicina, o 2DG. Por tanto, es de esperar que el aumento de A β con AICAR esté mediado por la activación de AMPK, mientras que el efecto antiamiloidogénico por Metformina, y puede que por 2DG, sea debido a otras dianas secundarias.

Con todo, la repercusión sobre la carga amiloide observada con los diferentes activadores de AMPK, Metformina, AICAR y 2DG, podría ser independiente de su efecto en autofagia, pero además Metformina y 2DG podrían tener un efecto en la amiloidosis independiente a la activación de AMPK. Por el contrario, el efecto proamiloidogénico de AICAR y su reversión por CoC podrían indicar una dependencia directa de la actividad de AMPK. No obstante, el papel de CoC en autofagia, acorde al esperado de la inhibición de AMPK, no generó el aumento de amiloide previsto por analogía al mecanismo de MRT e IN1. Mientras, AICAR, que sí incrementó los niveles de A β , no generó una inducción de autofagia como cabría esperar por el papel descrito para AMPK en autofagia. Por tanto, la AMPK podría estar implicada en mecanismos de regulación de la autofagia más complejos que los descritos hasta la fecha, específicos o no de neuronas, e incluso en el procesamiento amiloidogénico previo a su eliminación por autofagia. Así, realizamos estudios complementarios en SH-SY5Y con mutantes de AMPK para aclarar la implicación de esta quinasa en neuronas, pero hasta el momento no hemos observado diferencias concluyentes en autofagia (Datos no mostrados).

Diversos estudios han descrito un efecto antiamiloidogénico de AMPK por diferentes mecanismos, revisado en (Salminen et al., 2011; Liu and Chern, 2015). Contrario a nuestros resultados, se ha descrito un efecto antiamiloidogénico de la activación de AMPK, por AICAR por una disminución del procesamiento amiloidogénico de APP (Won et al., 2010), así como su reversión por CoC (Greco et al., 2009; Greco et al., 2011). En cambio, se ha descrito que la activación de AMPK por Metformina genera un mayor procesamiento amiloidogénico de APP por la inducción de BACE1 (Chen et al., 2009) o por inducción de autofagia (Son et al., 2016).

3.2. Metformina y AICAR aumentan la actividad fosfatasa disminuyendo los niveles de fosfo-tau.

Debido a los resultados antagónicos obtenidos para los activadores de AMPK Metformina y AICAR en la secreción de A β , quisimos discernir la implicación de estos en otros procesos celulares aparte de autofagia, ya sea de manera dependiente o independiente de AMPK. Está descrito que, a diferencia de AICAR, la Metformina es capaz de activar la fosfatasa PP2A que elimina los grupos fosfato de determinados epítomos de tau, entre otros (Kickstein et al., 2010). Por tanto, decidimos estudiar si AICAR y Metformina podrían tener diferente repercusión sobre el balance quinasa/fosfatasa neuronal, analizando diferentes sitios de fosforilación de tau. Observamos que tanto Metformina como AICAR generaban una disminución en la fosforilación de determinados epítomos de Tau comunes, como PHF1 o AT180, pero también diferían en otros. Así, la Metformina generó un efecto mucho más acusado en fosfoepítomos como AT8 o Tau1.

Como ya mencionamos en la Introducción, las dos principales fosfatasas descritas para tau son PP2A y PP2B, aunque otras como PP1 y PP5 también pueden actuar sobre sus fosfoepítomos. Puesto que un mismo fosfoepítomo puede ser diana de diferentes fosfatasas (Liu et al., 2005a; Simic et al.,

2016), procedimos a confirmar en nuestro sistema la sensibilidad de cada fosfoepítipo analizado las fosfatasa PP2A y PP2B, por la reversión de la defosforilación con los inhibidores específicos de las mismas. El inhibidor de PP2A Ácido Okadaico indicó una actividad principal de esta fosfatasa sobre los fosfoepítipos reconocidos por AT8 y Tau1, además de GSK-3 en S21/9 (Wang et al., 2015), lo que apoya una activación de esta fosfatasa por Metformina, como se pudo confirmar con la reversión parcial con los tratamientos combinados. En cambio, el inhibidor de PP2B Ciclosporina-A indicó una actividad principal de esta fosfatasa sobre los fosfoepítipos reconocidos por PHF1 y AT180, lo que apoya una activación de dicha fosfatasa tanto por Metformina como por AICAR. La aparente, aunque no significativa, menor fosforilación de PHF1 en presencia de Ácido Okadaico podría explicarse por la menor activación de GSK3 por PP2A. Curiosamente, CsA también provocó un aumento de la señal con Tau1 del epítipo defosforilado y una disminución de la señal de AT8, lo que sugiere una activación indirecta de PP2A.

Así pudimos confirmar el efecto de Metformina activador de PP2A, si bien en menor medida tanto Metformina como AICAR parecieron estimular la actividad de PP2B. No obstante, GSK3, activada por Metformina a través de PP2A, no solo se considera la principal quinasa causante de la hiperfosforilación de Tau en epítipos como los analizados con PHF1 y AT180 (Maqbool et al., 2016), sino que también se ha descrito que es capaz de aumentar la producción de A β (Hernandez et al., 2010). Por tanto, este hecho no explicaría, en un principio, el efecto antiamiloidogénico de Metformina, contrapuesto a AICAR. No obstante, puesto que la Metformina disminuyó tanto los niveles de A β como de fosforilación en PHF1 y AT180, consideramos que la activación de GSK3 específica tendría baja repercusión.

La defosforilación de los epítipos sensibles a PP2B tanto por Metformina como AICAR sugiere un mecanismo común de activación de la fosfatasa por AMPK. Acorde a esta hipótesis, se ha descrito la defosforilación de tau mediada por activación de AMPK por diferentes mecanismos (Greco et al., 2011; Kim et al., 2015), aunque no se correlacionó con la activación de fosfatasas sino con una inhibición de GSK3 (Greco et al., 2009), no detectada por nosotros. No obstante, no podemos descartar un efecto sobre PP2B de Metformina y AICAR independiente de AMPK ya que CoC y 2DG no generaron unos niveles de AT180 y PHF1 consistentes con los esperados por su modulación de AMPK. Conforme a esto, se ha descrito que la Ciclosporina-A activa AMPK (Park et al., 2011), por lo que la reversión del efecto de Metformina y AICAR sobre los epítipos AT180 y PHF1 sugiere la mediación necesaria de PP2B, pudiendo ser dependiente o no de AMPK.

Por tanto, observamos que Metformina y AICAR generaban una disminución de la fosforilación de Tau, asociada a la patología de Alzheimer. Este proceso parece estar mediado por la fosfatasa PP2B, además de la ya descrita en la bibliografía para Metformina PP2A.

3.3. Metformina, y en menor medida AICAR, generan una activación no apoptótica de caspasa3.

Las dos bandas de menor peso molecular observadas con el anticuerpo tau1 en presencia de Metformina podrían corresponderse a las isoformas de tau 3R (de menor peso molecular que las 4R) o a alguna modificación postraducciona. Sin embargo, su aparición ante los tratamientos prolongados de Ácido Okadaico, tóxicos, nos alertó de una correlación con la activación de caspasa-3. Así, observamos que Metformina y en menor medida AICAR, a diferencia de 2DG, generaban una

activación de caspasa 3 sin comprometer la viabilidad celular. Esto provocaba el corte proteolítico de tau dando lugar a fragmentos tau1 positivos. Estos resultados se vieron apoyados por una relación de dependencia espacial entre la caspasa-3 activa y tau1 en neuronas. Por tanto, esta activación de proteasas podría estar provocando una disminución de proteínas implicadas en la ruta amiloidogénica o en el transporte celular que explicara la disminución de A β secretado por Metformina.

Acorde con nuestros resultados, se ha descrito que una activación no apoptótica de caspasa-3 está implicada en procesos de remodelación del citoesqueleto y de las sinapsis (D'Amelio et al., 2011; Wang and Luo, 2014; Day et al., 2015). Así, con Metformina también pudimos apreciar una disminución de proteínas características de las sinapsis como PSD95. Conforme a esto, se ha descrito que tau tiene un papel estabilizador de receptores NMDA/PSD95, mientras que la fragmentación de tau hace que sea excluido de los terminales post-sinápticos reduciendo dicha estabilización y, consecuentemente, la excitotoxicidad provocada por A β (Ittner et al., 2010). Además, la modulación de los receptores post-sinápticos AMPA por caspasa-3 se ha descrito estar mediada por la activación de PP2B (D'Amelio et al., 2011). De esta manera, la activación de caspasa-3 por Metformina y AICAR podría ser el mecanismo mediador de la activación de PP2B observada previamente.

Así, la Metformina podría tener efectos neuroprotectores en pacientes de la EA mediados por su efecto antiamiloidogénico y la defosforilación de tau, aunque también hemos detectado una proteólisis de tau que, hasta la fecha, se ha relacionado mayoritariamente con su agregación y propagación trans-sináptica (Hanger and Wray, 2010; Medina et al., 2016). Por otro lado, la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones por Metformina, podría provocar un estado quiescente de la mitocondria favoreciendo la resistencia a apoptosis por inducción del denominado Efecto Warburg (EW), revisado en (Demetrius et al., 2014; Atlante et al., 2017). La hipótesis de la patología de Alzheimer conocida como Efecto Warburg Inverso sostiene que la disfunción mitocondrial asociada a la edad provoca un aumento de la fosforilación oxidativa desproporcionado como intento compensatorio para suplir las carencias energéticas. Así, la inducción del EW por Metformina podría generar un preconditionamiento en la neurona, previniéndola frente a la toxicidad generada por A β en la mitocondria y reduciendo la generación de agentes oxidantes.

Podemos concluir que la Metformina presenta diversos efectos neuroprotectores, aunque estos no parecen estar mediados por autofagia. Los datos contrapuestos obtenidos para Metformina y AICAR parecen ser el resultado de un delicado balance en los sistemas de proteostasis celular. Estos compuestos presentan diferentes efectos mediados por AMPK, pero también por otras cascadas de señalización independientes. Un estudio más exhaustivo sería necesario para una mejor caracterización de los efectos de los mismos en el metabolismo de nuestros sistemas neuronales. No obstante, debido a la delicadeza de la regulación de la vía AMPK en neuronas, a los efectos contrapuestos obtenidos en los niveles de A β secretados tras su activación con diferentes compuestos, así como a la presumible independencia de la modulación de autofagia por AMPK en dichos niveles de A β , decidimos buscar otras estrategias de inducción de autofagia no relacionadas con esta vía.

4. Análisis del efecto anti-amiloidogénico de la Trehalosa en neuronas.

Como sistema alternativo a la regulación dependiente de AMPK/mTORC1, nos propusimos analizar el efecto del disacárido Trehalosa, descrito como un potente inductor de autofagia con efectos neuroprotectores (Sarkar et al., 2007; Aguib et al., 2009; Yang and Yu, 2009; Kruger et al., 2012; Schaeffer et al., 2012; Castillo et al., 2013), aunque su mecanismo molecular es controvertido.

En primer lugar, realizamos un ensayo *in vivo* en nuestro modelo murino de la enfermedad de Alzheimer para observar si la ingesta de Trehalosa generaba una reducción en la amiloidosis. Aunque pudimos observar ciertas tendencias, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en el tiempo y condiciones ensayadas. La falta de una diana molecular directa descrita para este compuesto nos impidió poder detectar si la Trehalosa había podido atravesar la barrera hematoencefálica y, en este caso, si la concentración era suficiente para un posible efecto terapéutico. Si bien se ha descrito la hidrólisis de Trehalosa por la flora presente en la pared intestinal, estudios previos afirman la llegada a cerebro de este compuesto tras su ingesta (Tanaka et al., 2004), así como la inducción de autofagia en el mismo (Schaeffer et al., 2012). A su vez, la falta de resultados concluyentes pudo deberse a otros factores como que el periodo de administración no fuera lo suficientemente prolongado o que los ratones presentaran fases demasiado avanzadas de amiloidosis. Con todo, no pudimos descartar que la Trehalosa tenga o no potencial terapéutico como inductor de autofagia inocuo.

La administración directa de Trehalosa a neuronas APP/PS1 en cambio sí que generó una drástica disminución de los niveles de A β secretados al medio. Este resultado nos confirmó que efectivamente la Trehalosa ejerce un efecto anti-amiloidogénico en neuronas que podría resultar beneficioso para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a proteinopatías como la Enfermedad de Alzheimer.

4.1. Efecto de la Trehalosa en neuronas: señalización y modulación de la autofagia.

Al administrar Trehalosa a cultivos neuronales, observamos una ligera inhibición de la vía de mTORC1 a tiempos cortos, según la fosforilación de S6, que se perdía gradualmente. Estos resultados nos llevaron a plantearnos la existencia de una dualidad en el efecto de la Trehalosa según la duración del tratamiento. Así observamos que, según los marcadores autofágicos estudiados, a tiempos cortos (4h) la Trehalosa era capaz de aumentar el flujo autofágico eficientemente. Sin embargo, este efecto inductor se perdía a tiempos largos de 24h.

No obstante, comprobamos que la funcionalidad del lisosoma permanecía intacta tras 24h de tratamiento con Trehalosa, al mantener tasas de degradación de los adaptadores autofágicos NBR1 y P62 análogas a las basales de autofagia, pero también al conservar las condiciones de pH ácido y los niveles de actividad según una de las hidrolasas lisosomales, la cathepsina D. Estos resultados contradicen los descritos recientemente por un grupo según los cuales la Trehalosa inhibía la degradación lisosomal y más concretamente la activación de la cathepsina D (Tien et al., 2016).

Por tanto, si bien la Trehalosa no afectaba a la degradación lisosomal a largo plazo, sí perdía la capacidad inductora de autofagia observada a corto plazo. Por tanto, descartamos que el efecto antiamiloidogénico observado estuviera mediado por un aumento de flujo autofágico.

4.2. Trehalosa disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP por segregación trans-Golgi de APP y BACE1.

Confirmamos que el efecto antiamiloidogénico de la Trehalosa no estaba mediado por autofagia al prevenir su inducción con los inhibidores de formación de autofagosomas MRT e IN1, que no revertían la disminución de los niveles de A β secretados por CGN APP/PS1.

Al incubar CGN WT con medio condicionado en neuronas APP/PS1, no observamos una disminución de A β extracelular. Esto hacía improbable la hipótesis de una eliminación del péptido ya secretado, bien sea por enzimas de degradación extracelulares o por su endocitosis. Tampoco observamos que hubiera una menor secreción del mismo por acúmulo intracelular. Esto nos llevó a plantearnos un efecto de la Trehalosa en el procesamiento amiloidogénico de APP.

Al analizar los productos de proteólisis de APP, observamos que efectivamente la Trehalosa, así como otro disacárido como Sacarosa, eran capaces de disminuir el procesamiento amiloidogénico de APP.

Un posible mecanismo de disminución del procesamiento amiloidogénico de APP podría ser su menor endocitosis. Puesto que anteriormente no habíamos observado diferencias en la endocitosis de A β , en principio no consideramos que la de APP pudiera verse modificada. Además, el componente PIK3C3/Vps34 del complejo PI3KCIII también participa en la endocitosis (Barth and Kohler, 2014), por lo que cabría esperar que su inhibición con VPS34-IN1 hubiera disminuído los niveles de A β , de haber tenido una gran repercusión la endocitosis de APP en nuestro sistema neuronal. Esto parece indicar que la modificación del procesamiento de APP por Trehalosa es previo.

Los lisosomas, aparte de ser el principal orgánulo de degradación proteica, también se han propuesto como sitio de procesamiento amiloidogénico de APP debido a su pH ácido óptimo para la actividad de la beta-secretasa (Haass et al., 2012). La aspartil proteasa catepsina D, al igual que BACE1, se identificó como una importante beta-secretasa capaz de generar péptido amiloide en entornos ácidos, siendo 280 veces más abundante en el cerebro humano que BACE1 (Schechter and Ziv, 2008). Si bien observamos que Trehalosa generaba un aumento del tamaño de lisosomas Lamp-1 positivos, éste no afectó ni a la funcionalidad ni a la localización de las proteínas APP y BACE1 al mismo. Por tanto, estos resultados nos permitieron descartar que el efecto antiamiloidogénico de Trehalosa estuviese mediado por una menor actividad beta-secretasa en el lisosoma.

Realizamos un estudio cualitativo de la ultraestructura de nuestros cultivos de neuronas por microscopía electrónica de transmisión con el fin de detectar otras modificaciones citoplasmáticas por la Trehalosa. Así, nos llamó la atención la morfología del AG, aparentemente más laxo y con cisternas más anchas en aquellas células tratadas con Trehalosa respecto al control. Esto nos hizo plantearnos si la Trehalosa podría estar alterando el procesamiento postraducciona proteico y/o su transporte a través de la red Golgi. Por experimentos preliminares de marcaje inmunofluorescente, observamos que las proteínas APP y BACE1 disminuían su colocalización en neuronas tratadas con Trehalosa. Si bien aumentaba la distribución de APP en compartimentos de la red trans-Golgi, una aproximación indirecta, por incompatibilidad de secundarios, sugería una menor translocación de BACE1 del cis al trans-Golgi. Esto podría explicar la deslocalización de ambas proteínas y por tanto el menor procesamiento amiloidogénico y secreción de A β . No obstante, esta hipótesis es preliminar y un estudio por marcaje directo es esencial para su validación.

Las grandes vesículas Lamp-1 positivas observadas tanto en las células tratadas con Trehalosa como con Sacarosa, están acorde con el ensanchamiento lisosomal descrito para oligosacáridos de cuyas hidrolasas carece la célula (Higuchi et al., 2015; Chen et al., 2016), pero también para otros procesos de macropinocitosis (Li et al., 2010). Dicho ensanchamiento lisosomal se ha relacionado con un aumento de autofagia independiente de mTORC1 por un incremento de los niveles de LC3II. Si bien, no detectaron modificaciones en otras proteínas ATG ni en adaptadores autofágicos como P62 que indicaran una mayor tasa de degradación por autofagia, y la prevención de la formación de autofagosomas no modificó dicho ensanchamiento lisosomal (Li et al., 2010; Higuchi et al., 2015; Chen et al., 2016). El ensanchamiento de lisosomas como resultado de la endocitosis de Sacarosa se conoce como sucrosoma, y se ha descrito que genera un aumento de la actividad de las enzimas lisosomales (Kato et al., 1984), así como de la expresión de genes lisosomales, del tráfico de vesículas y del metabolismo lipídico (Helip-Wooley and Thoene, 2004). Entre las proteínas sobreexpresadas se encuentran algunas relacionadas con la integridad de la red transgolgi y el tráfico entre el aparato de Golgi y el sistema endo/lisosomal (Helip-Wooley and Thoene, 2004). Esto podría explicar las diferencias observadas en la ultraestructura del aparato de Golgi con Trehalosa en nuestros resultados. No obstante, los datos de colocalización y distribución en el aparato de Golgi, mostraron una segregación de APP y BACE1 al tratar las neuronas con Trehalosa, pero no con Sacarosa. Si bien estos datos son preliminares, por lo que su confirmación en experimentos independientes es esencial para determinar un posible mecanismo independiente de Trehalosa o común con Sacarosa.

En los últimos años, diferentes grupos han descrito mecanismos de acción específicos de la Trehalosa. DeBosch *et al.* describieron que Trehalosa, tras ser internalizada en la célula por el transportador SLC2A8 (GLUT8) (Mayer et al., 2016), inhibe los transportadores SLC2A/GLUT, previniendo el transporte de glucosa y estimulando autofagia por activación de AMPK (DeBosch et al., 2016). Por otro lado, Palmieri *et al.* describieron una inducción del factor de transcripción TFEB por la inhibición de Akt por Trehalosa (Palmieri et al., 2017). En cambio, nuestros resultados no mostraron modificaciones en los niveles de fosforilación de AMPK, o de sus dianas ACC o ULK1, así como de Akt (datos no mostrados). También se ha descrito la capacidad de Trehalosa de prevenir la toxicidad celular derivada de una disfunción del proteosoma por inducción de macroautofagia y autofagia mediada por chaperona, así como de mejorar la actividad del proteosoma (Casarejos et al., 2011; Fernandez-Estevéz et al., 2014). Acorde con nuestros resultados, la mejora de la autofagia mediada por chaperona podría ser una consecuencia del aumento de membrana lisosomal y por tanto de proteínas asociadas a la misma como Lamp1 y Lamp2.

En conclusión, si bien la Trehalosa es capaz de mejorar la eficiencia de degradación por autofagia a corto plazo, planteamos un modelo preliminar del mecanismo de acción en la disminución de los niveles de A β secretados por neuronas a largo plazo. Según éste, la Trehalosa genera una modificación en el sistema de endomembranas y más concretamente en el aparato de Golgi, causante de la segregación de las proteínas APP y BACE1 en la red trans-Golgi. La deslocalización espacial de estas proteínas disminuye el subsecuente procesamiento amiloidogénico de APP y, por tanto, la secreción de A β al medio.

5. Perspectivas futuras.

Nuestros resultados apoyan un efecto antiamiloidogénico de la autofagia, por lo que su inducción supone una interesante estrategia terapéutica. Si bien, las diferencias observadas en neuronas en las rutas de señalización implicadas hacen necesaria la profundización en su estudio específico. Así, una aproximación podría ser la búsqueda de biomoléculas frente a marcadores autofágicos en cultivos de neuronas. Clásicamente, se ha empleado el marcador específico de vesículas autofágicas LC3II como indicador directo de la inducción de autofagia, una vez descartado su bloqueo. Sin embargo, la eficiencia característica de las neuronas, entre la síntesis de la AV y la fusión con el lisosoma, dificulta la detección de dicha inducción sin un experimento de flujo. Nosotros identificamos que la reducción de P62 a largo plazo constituía un mejor indicador de autofagia inducida de manera prolongada en el tiempo, especialmente interesante para posibles aplicaciones terapéuticas.

Acorde con esto, el inhibidor Rapamicina mostró un efecto antiamiloidogénico en ratones modelo de Alzheimer. No obstante, sus importantes efectos inmunosupresores limitan su uso como terapia a largo plazo. Su empleo crónico requeriría dosificaciones intermitentes y controladas que podrían disminuir su efecto terapéutico. Por tanto, es de especial interés el desarrollo de análogos con menores efectos secundarios como Everolimus o Temsirolimus (Arriola Apelo et al., 2016). Además, el descubrimiento de diferentes mecanismos inductores de autofagia, como la activación de JNK, abre la puerta al desarrollo de nuevos fármacos para la confirmación o no de este proceso como diana terapéutica en la EA.

Si bien no observamos una inducción de autofagia mantenida en el tiempo con Trehalosa, sí que generó un importante efecto antiamiloidogénico. Por tanto, su empleo como terapéutico frente a la patología de Alzheimer podría ser de interés, si bien habría que confirmar su efectividad *in vivo*. A diferencia de la Sacarosa, la Trehalosa no es degradada por células de mamífero, por lo que, una vez ingerida, es capaz de llegar a cerebro según se ha descrito (Tanaka et al., 2004). No obstante, parte puede ser degradada por la flora intestinal. Recientemente se han desarrollado análogos de Trehalosa denominados lentzTrehalosas A, B y C, con mayor biodisponibilidad (Wada et al., 2015; Wada et al., 2016). Así, su testaje en el modelo murino de Alzheimer en ratones adultos, y neuronas, podría ser de interés para comprobar si atraviesan la barrera hematoencefálica y presentan un efecto antiamiloidogénico terapéutico *in vivo*.

CONCLUSIONES

1. La autofagia y la vía de señalización mTORC1 se encuentran alteradas en la patología de Alzheimer, tanto en tejido cerebral *post mortem* de pacientes como de ratones APP/PS1.
2. Existe una autofagia basal eficiente en neuronas, donde la inhibición de mTORC1 con Rapamicina genera un ligero aumento de flujo, siendo este efecto moderado con respecto a los sistemas neuronales frente a líneas celulares con altas tasas de división.
3. La inhibición de mTORC1 con Rapamicina correlaciona con una bajada estadísticamente significativa del beta amiloide (1-40) en cerebros de ratones doble transgénicos APP/PS1.
4. La autofagia basal e inducida por la inhibición de mTORC1 con Rapamicina presenta un efecto anti-amiloidogénico en neuronas APP/PS1, acorde con los resultados obtenidos in vivo en dichos ratones transgénicos modelo de Alzheimer.
5. La actividad basal de AMPK es necesaria para la iniciación de la autofagia en neuronas, como sugiere el inhibidor de AMPK. Si bien su mayor estimulación, usando diferentes compuestos químicos moduladores de la misma, no genera un incremento de flujo en neuronas.
6. Los niveles de A β secretados por neuronas APP/PS1 no parecen correlacionar directamente con la modulación de autofagia por AMPK, al menos con los compuestos químicos ensayados (2DG, Metformina, AICAR o Compuesto C).
7. Observamos en neuronas primarias que Metformina, y en menor medida AICAR, aumentan la actividad de la fosfatasa PP2B y de la caspasa-3 sin afectar a la viabilidad, generando cambios en el citoesqueleto neuronal según el análisis de diferentes fosfoepítomos de Tau. También comprobamos la inhibición de PP2A por Metformina, pero no por AICAR, ya descrita en la bibliografía.
8. La Trehalosa, aunque a corto plazo aumenta el flujo autofágico, a tiempos prolongados de 24h-48h disminuye los niveles de beta-amiloide secretados por neuronas de manera independiente de autofagia; mientras que no encontramos efectos significativos en cerebros de ratones APP/PS1.
9. El análisis del efecto de la Trehalosa en neuronas nos indicó que tratamientos prolongados provocan la disminución del procesamiento amiloidogénico de APP. Nuestros datos preliminares sugieren que este efecto es consecuencia de la modificación del sistema de endomembranas, y en particular del aparato de Golgi, que conlleva la segregación de las proteínas APP y BACE1 cuya separación física impide su interacción y corte proteolítico.

BIBLIOGRAFÍA

- Agostinho P, Pliassova A, Oliveira CR, Cunha RA (2015) Localization and Trafficking of Amyloid-beta Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 45:329-347.
- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schatzl HM, Ertmer A (2009) Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* 5:361-369.
- Araki W (2016) Post-translational regulation of the beta-secretase BACE1. *Brain research bulletin* 126:170-177.
- Ariosa AR, Klionsky DJ (2016) Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*.
- Arriola Apelo SI, Neuman JC, Baar EL, Syed FA, Cummings NE, Brar HK, Pumper CP, Kimple ME, Lamming DW (2016) Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. 15:28-38.
- Athanassakis I, Protopapadakis E, Vassiliadis S (2000) Localization of pepstatin's inhibitory action during Fc-mediated antibody internalization: possible implications for antibody-mediated viral transmission. *Cellular immunology* 199:81-88.
- Atlante A, de Bari L, Bobba A, Amadoro G (2017) A disease with a sweet tooth: exploring the Warburg effect in Alzheimer's disease. *Biogerontology*.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological reviews* 84:361-384.
- Bago R, Malik N, Munson MJ, Prescott AR, Davies P, Sommer E, Shpiro N, Ward R, Cross D, Ganley IG, Alessi DR (2014) Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* 463:413-427.
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging* 9:535-551.
- Barth JM, Kohler K (2014) How to take autophagy and endocytosis up a notch. *BioMed research international* 2014:960803.
- Bilanges B, Vanhaesebroeck B (2014) Cinderella finds her shoe: the first Vps34 inhibitor uncovers a new PI3K-AGC protein kinase connection. *The Biochemical journal* 464:e7-10.
- Boland B, Smith DA, Mooney D, Jung SS, Walsh DM, Platt FM (2010) Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 285:37415-37426.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:6926-6937.

- Borland H, Vilhardt F (2017) Prelysosomal Compartments in the Unconventional Secretion of Amyloidogenic Seeds. *International journal of molecular sciences* 18.
- Bouley SJ, Maginnis MS, Derdowski A, Gee GV, O'Hara BA, Nelson CD, Bara AM, Atwood WJ, Dugan AS (2014) Host cell autophagy promotes BK virus infection. *Virology* 456-457:87-95.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15:713-720.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82:239-259.
- Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S (2010) Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *The Journal of biological chemistry* 285:13107-13120.
- Caccamo A, De Pinto V, Messina A, Branca C, Oddo S (2014) Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:7988-7998.
- Caccamo A, Maldonado MA, Majumder S, Medina DX, Holbein W, Magri A, Oddo S (2011) Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism. *The Journal of biological chemistry* 286:8924-8932.
- Caccamo A, Magri A, Medina DX, Wisely EV, Lopez-Aranda MF, Silva AJ, Oddo S (2013) mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Aging cell* 12:370-380.
- Caccamo A, Branca C, Talboom JS, Shaw DM, Turner D, Ma L, Messina A, Huang Z, Wu J, Oddo S (2015) Reducing Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Expression Improves Spatial Memory and Synaptic Plasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:14042-14056.
- Carroll B, Korolchuk VI, Sarkar S (2015) Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino acids* 47:2065-2088.
- Casarejos MJ, Solano RM, Gomez A, Perucho J, de Yébenes JG, Mena MA (2011) The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochemistry international* 58:512-520.
- Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, Court FA, van Zundert B, Hetz C (2013) Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 9:1308-1320.
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry* 229:558-565.

- Cummings J, Aisen PS, DuBois B, Frolich L, Jack CR, Jr., Jones RW, Morris JC, Raskin J, Dowsett SA, Scheltens P (2016) Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimer's research & therapy* 8:39.
- Che Q, Lin L, Ai Q, Ge P, Dai J, Jiang R, Zhou D, Wan J, Zhang L (2015) Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose alleviated lethal liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 459:541-546.
- Chen S, Zhou L, Zhang Y, Leng Y, Pei XY, Lin H, Jones R, Orlowski RZ, Dai Y, Grant S (2014) Targeting SQSTM1/p62 induces cargo loading failure and converts autophagy to apoptosis via NBK/Bik. *Molecular and cellular biology* 34:3435-3449.
- Chen X, Li M, Li L, Xu S, Huang D, Ju M, Huang J, Chen K, Gu H (2016) Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway. *Scientific reports* 6:28423.
- Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, Thompson RC, Zhao Y, Smith L, Gasparini L, Luo Z, Xu H, Liao FF (2009) Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3907-3912.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell death and differentiation* 17:1104-1114.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 14:69-76.
- Dai YL, Huang SL, Leng Y (2015) AICAR and Metformin Exert AMPK-dependent Effects on INS-1E Pancreatic beta-cell Apoptosis via Differential Downstream Mechanisms. *International journal of biological sciences* 11:1272-1280.
- Day RJ, Mason MJ, Thomas C, Poon WW, Rohn TT (2015) Caspase-Cleaved Tau Co-Localizes with Early Tangle Markers in the Human Vascular Dementia Brain. *PloS one* 10:e0132637.
- DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN, Davidson NO, Yarasheski KE, Hruz PW, Moley KH (2016) Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Science signaling* 9:ra21.
- Demetrius LA, Magistretti PJ, Pellerin L (2014) Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Frontiers in physiology* 5:522.
- Fernandez-Estevez MA, Casarejos MJ, Lopez Sendon J, Garcia Caldentey J, Ruiz C, Gomez A, Perucho J, de Yebenes JG, Mena MA (2014) Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PloS one* 9:e90202.

- Gowrishankar S, Yuan P, Wu Y, Schrag M, Paradise S, Grutzendler J, De Camilli P, Ferguson SM (2015) Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:E3699-3708.
- Greco SJ, Hamzelou A, Johnston JM, Smith MA, Ashford JW, Tezapsidis N (2011) Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and beta-amyloid in neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 414:170-174.
- Greco SJ, Sarkar S, Casadesus G, Zhu X, Smith MA, Ashford JW, Johnston JM, Tezapsidis N (2009) Leptin inhibits glycogen synthase kinase-3 β to prevent tau phosphorylation in neuronal cells. *Neuroscience letters* 455:191-194.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 2:a006270.
- Hanger DP, Wray S (2010) Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochemical Society transactions* 38:1016-1020.
- Hartman AL, Santos P, Dolce A, Hardwick JM (2012) The mTOR inhibitor rapamycin has limited acute anticonvulsant effects in mice. *PloS one* 7:e45156.
- Hawley SA, Ross FA, Gowans GJ, Tibarewal P, Leslie NR, Hardie DG (2014) Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells. *The Biochemical journal* 459:275-287.
- Helip-Wooley A, Thoene JG (2004) Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Experimental cell research* 292:89-100.
- Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62:1377-1391.
- Hernandez F, Avila J (2007) Tauopathies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64:2219-2233.
- Hernandez F, Gomez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J (2010) GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental neurology* 223:322-325.
- Higuchi T, Nishikawa J, Inoue H (2015) Sucrose induces vesicle accumulation and autophagy. *Journal of cellular biochemistry* 116:609-617.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Gotz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387-397.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular engineering* 17:157-165.
- Jeon SM (2016) Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & molecular medicine* 48:e245.

- Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu FX, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracchi VS, Guan KL (2015) Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science (New York, NY)* 347:194-198.
- Jiang H, Vogt PK (2008) Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene* 27:5729-5740.
- Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7:279-296.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19:5720-5728.
- Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols* 1:2406-2415.
- Kato T, Okada S, Yutaka T, Yabuuchi H (1984) The effects of sucrose loading on lysosomal hydrolases. *Molecular and cellular biochemistry* 60:83-98.
- Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, Williamson R, Fuchs M, Kohler A, Glossmann H, Schneider R, Sutherland C, Schweiger S (2010) Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:21830-21835.
- Kim B, Figueroa-Romero C, Pacut C, Backus C, Feldman EL (2015) Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 290:19146-19157.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13:132-141.
- Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL (2013) Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152:290-303.
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular cell* 33:505-516.
- Klionsky DJ et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1-222.
- Kruger U, Wang Y, Kumar S, Mandelkow EM (2012) Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiology of aging* 33:2291-2305.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274-293.
- Laurent-Matha V, Derocq D, Prebois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman E (2006) Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *Journal of biochemistry* 139:363-371.

- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158.
- Li C, Macdonald JI, Hryciw T, Meakin SO (2010) Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *Journal of neurochemistry* 112:882-899.
- Li Q, Liu Y, Sun M (2017) Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cellular and molecular neurobiology* 37:377-388.
- Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, Xavier RJ, Li C, Yankner BA, Scherzer CR, Yuan J (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14164-14169.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005a) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *The European journal of neuroscience* 22:1942-1950.
- Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg HV, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D, Yuan J (2011) Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147:223-234.
- Liu R, Barkhordarian H, Emadi S, Park CB, Sierks MR (2005b) Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiology of disease* 20:74-81.
- Liu YJ, Chern Y (2015) AMPK-mediated regulation of neuronal metabolism and function in brain diseases. *Journal of neurogenetics* 29:50-58.
- Mairet-Coello G, Polleux F (2014) Involvement of 'stress-response' kinase pathways in Alzheimer's disease progression. *Current opinion in neurobiology* 27:110-117.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 6:458-471.
- Maqbool M, Mobashir M, Hoda N (2016) Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry* 107:63-81.
- Mardones P, Rubinsztein DC, Hetz C (2016) Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport. *Science signaling* 9:fs2.
- Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL (2015) Alzheimer's disease. *Nature reviews Disease primers* 1:15056.
- Mayer AL, Higgins CB, Heitmeier MR, Kraft TE, Qian X, Crowley JR, Hyrc KL, Beatty WL, Yarasheski KE, Hruz PW, DeBosch BJ (2016) SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Scientific reports* 6:38586.

- Medina M, Avila J (2015) Further understanding of tau phosphorylation: implications for therapy. *Expert review of neurotherapeutics* 15:115-122.
- Medina M, Hernandez F, Avila J (2016) New Features about Tau Function and Dysfunction. *Biomolecules* 6.
- Meijer AJ, Lorin S, Blommaert EF, Codogno P (2015) Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino acids* 47:2037-2063.
- Menzies FM, Huebener J, Renna M, Bonin M, Riess O, Rubinsztein DC (2010) Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain : a journal of neurology* 133:93-104.
- Menzies FM et al. (2017) Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93:1015-1034.
- Mestre MB, Colombo MI (2012) cAMP and EPAC are key players in the regulation of the signal transduction pathway involved in the alpha-hemolysin autophagic response. *PLoS pathogens* 8:e1002664.
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728-741.
- Moruno Manchon JF, Uzor NE, Finkbeiner S, Tsvetkov AS (2016) SPHK1/sphingosine kinase 1-mediated autophagy differs between neurons and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Autophagy* 12:1418-1424.
- Munson MJ, Allen GF, Toth R, Campbell DG, Lucocq JM, Ganley IG (2015) mTOR activates the VPS34-UVRAG complex to regulate autolysosomal tubulation and cell survival. *The EMBO journal* 34:2272-2290.
- Nakamura S, Yoshimori T (2017) New insights into autophagosome-lysosome fusion.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:11382-11388.
- Nilsson P, Saido TC (2014) Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease Abeta peptide. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36:570-578.
- Nixon RA, Yang DS (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiology of disease* 43:38-45.
- Ordóñez-Gutiérrez L, Anton M, Wandosell F (2015) Peripheral amyloid levels present gender differences associated with aging in AbetaPP/PS1 mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 44:1063-1068.
- Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, Lotfi P, Stinnett GR, Seymour ML, Chaudhury A, Bajaj L, Bondar VV, Bremner L, Saleem U, Tse DY, Sanagasetti D, Wu SM, Neilson JR, Pereira FA, Pautler RG, Rodney

- GG, Cooper JD, Sardiello M (2017) mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nature communications* 8:14338.
- Park HG, Yi H, Kim SH, Yu HS, Ahn YM, Lee YH, Roh MS, Kim YS (2011) The effect of cyclosporine A on the phosphorylation of the AMPK pathway in the rat hippocampus. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:1933-1937.
- Pei JJ, An WL, Zhou XW, Nishimura T, Norberg J, Benedikz E, Gotz J, Winblad B (2006) P70 S6 kinase mediates tau phosphorylation and synthesis. *FEBS letters* 580:107-114.
- Petherick KJ, Conway OJ, Mpamhanga C, Osborne SA, Kamal A, Saxty B, Ganley IG (2015) Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *The Journal of biological chemistry* 290:28726.
- Podhorecka M, Ibanez B, Dmoszynska A (2017) Metformin - its potential anti-cancer and anti-aging effects. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 71:170-175.
- Renna M, Bento CF, Fleming A, Menzies FM, Siddiqi FH, Ravikumar B, Puri C, Garcia-Arencibia M, Sadiq O, Corrochano S, Carter S, Brown SD, Acevedo-Arozena A, Rubinsztein DC (2013) IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy. *Human molecular genetics* 22:4528-4544.
- Richardson A, Galvan V, Lin AL, Oddo S (2015) How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Experimental gerontology* 68:51-58.
- Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC, Ferguson SM (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling* 5:ra42.
- Roscic A, Baldo B, Crochemore C, Marcellin D, Paganetti P (2011) Induction of autophagy with catalytic mTOR inhibitors reduces huntingtin aggregates in a neuronal cell model. *Journal of neurochemistry* 119:398-407.
- Rubinsztein DC, Nixon RA (2010) Rapamycin induces autophagic flux in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:E181; author reply E182.
- Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current biology* : CB 22:R29-34.
- Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB (2011) Alzheimer's disease: a review of recent developments. *Annals of African medicine* 10:73-79.
- Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M (2011) AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 118:460-474.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, Ojala J, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M (2013) Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Progress in neurobiology* 106-107:33-54.

- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22:159-168.
- Sarkar S, Rubinsztein DC (2008) Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Molecular bioSystems* 4:895-901.
- Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC (2009) Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell death and differentiation* 16:46-56.
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC (2007) Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 282:5641-5652.
- Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960-976.
- Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M (2012) Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain : a journal of neurology* 135:2169-2177.
- Schechter I, Ziv E (2008) Kinetic properties of cathepsin D and BACE 1 indicate the need to search for additional beta-secretase candidate(s). *Biological chemistry* 389:313-320.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine* 8:595-608.
- Shen C, Ka SO, Kim SJ, Kim JH, Park BH, Park JH (2016) Metformin and AICAR regulate NANOG expression via the JNK pathway in HepG2 cells independently of AMPK. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37:11199-11208.
- Shimobayashi M, Hall MN (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* 15:155-162.
- Simic G, Babic Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milosevic N, Bazadona D, Buee L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischik C, Hof PR (2016) Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6:6.
- Son SM, Shin HJ, Byun J, Kook SY, Moon M, Chang YJ, Mook-Jung I (2016) Metformin Facilitates Amyloid-beta Generation by beta- and gamma-Secretases via Autophagy Activation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 51:1197-1208.
- Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 5:e9979.
- Stoka V, Turk V, Turk B (2016) Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing research reviews* 32:22-37.

- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature medicine* 10:148-154.
- Tien NT, Karaca I, Tamboli IY, Walter J (2016) Trehalose Alters Subcellular Trafficking and the Metabolism of the Alzheimer-associated Amyloid Precursor Protein. 291:10528-10540.
- Tsvetkov AS, Mitra S, Finkbeiner S (2009) Protein turnover differences between neurons and other cells. *Autophagy* 5:1037-1038.
- Tsvetkov AS, Miller J, Arrasate M, Wong JS, Pleiss MA, Finkbeiner S (2010) A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:16982-16987.
- Tsvetkov AS, Arrasate M, Barmada S, Ando DM, Sharma P, Shaby BA, Finkbeiner S (2013) Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nature chemical biology* 9:586-592.
- Vincent EE, Coelho PP, Blagih J, Griss T, Viollet B, Jones RG (2015) Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene* 34:3627-3639.
- Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E, Prica M, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V (2011) Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 7:40-50.
- Wada S, Kubota Y, Sawa R, Umekita M, Hatano M, Ohba S, Hayashi C, Igarashi M, Nomoto A (2015) Novel autophagy inducers lentztrehaloses A, B and C. *The Journal of antibiotics* 68:521-529.
- Wada S, Sawa R, Ohba S, Hayashi C, Umekita M, Shibuya Y, Iijima K, Iwanami F, Igarashi M (2016) Stability and Bioavailability of Lentztrehaloses A, B, and C as Replacements for Trehalose. *Journal of agricultural and food chemistry* 64:7121-7126.
- Wang JY, Luo ZG (2014) Non-apoptotic role of caspase-3 in synapse refinement. *Neuroscience bulletin* 30:667-670.
- Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B (2012) Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science (New York, NY)* 338:956-959.
- Wang Y, Yang R, Gu J, Yin X, Jin N, Xie S, Wang Y, Chang H, Qian W, Shi J, Iqbal K, Gong CX, Cheng C, Liu F (2015) Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 β and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation. *Neurobiology of aging* 36:188-200.
- Won JS, Im YB, Kim J, Singh AK, Singh I (2010) Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 399:487-491.

- Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J (2010) Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* 6:61-66.
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* 23:33-42.
- Yang CR, Yu RK (2009) Intracerebral transplantation of neural stem cells combined with trehalose ingestion alleviates pathology in a mouse model of Huntington's disease. *Journal of neuroscience research* 87:26-33.
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain : a journal of neurology* 134:258-277.
- Yerbury JJ, Ooi L, Dillin A, Saunders DN, Hatters DM, Beart PM, Cashman NR, Wilson MR, Ecroyd H (2016) Walking the tightrope: proteostasis and neurodegenerative disease. *Journal of neurochemistry* 137:489-505.
- Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, Lim TH, Pastorino L, Kunwar AJ, Walton JC, Nagahara AH, Lu KP, Nelson RJ, Tuszyński MH, Huang K (2012) JNK3 perpetuates metabolic stress induced by Abeta peptides. *Neuron* 75:824-837.
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry* 266:17707-17712.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465:942-946.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology* 171:87-98.
- Yuan L, Barriocanal JG, Bonifacino JS, Sandoval IV (1987) Two integral membrane proteins located in the cis-middle and trans-part of the Golgi system acquire sialylated N-linked carbohydrates and display different turnovers and sensitivity to cAMP-dependent phosphorylation. *The Journal of cell biology* 105:215-227.
- Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y (2014) 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters* 355:176-183.
- Zhang S, Salemi J, Hou H, Zhu Y, Mori T, Giunta B, Obregon D, Tan J (2010) Rapamycin promotes beta-amyloid production via ADAM-10 inhibition. *Biochemical and biophysical research communications* 398:337-341.

- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* 108:1167-1174.
- Zhou XW, Tanila H, Pei JJ (2008) Parallel increase in p70 kinase activation and tau phosphorylation (S262) with Abeta overproduction. *FEBS letters* 582:159-164.
- Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF (2015) MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience reports* 35.

ANEXO: PUBLICACIONES

Relación de publicaciones del doctorando:

Ordoñez-Gutierrez L, Fernandez-Perez, Herrera JL, Anton M, Benito-Cuesta I, Wandosell F. A β PP/PS1 Transgenic Mice Show Sex Differences in the Cerebellum Associated with Aging. *J Alzheimers Dis.* 2016 Sep 6;54(2):645-56. doi: 10.3233/JAD-160572.

Lara Ordóñez-Gutiérrez, Irene Benito-Cuesta, Pedro Rayo, Josefina Casas, Gemma Fabrias and Francisco Wandosell. Dihydroceramide desaturase 1 inhibitors reduce β -amyloid levels in primary neurons from AD transgenic model (Manuscript in preparation)

Irene Benito-Cuesta, Héctor Diez, Lara Ordoñez, and Francisco Wandosell. BOOK “Assessment of autophagy in neurons and in brain tissue.”Chapter: Method in Autophagy: Analysis using neurons and brain samples. Invited Review: *Cells—MDPI* (Junio, 2017) (Manuscript in preparation)

“Complex modulation of autophagy in neurons by mTOR1 and AMPK: Role in amyloidosis” (Manuscript in preparation)

“The disaccharide Trehalose reduce b-amyloid modifying the subcellular distribution of APP and BACE but not stimulating autophagy” (Manuscript in preparation)